

NUMBER 22

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2008

財団法人 発酵研究所

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 22



2 0 0 8

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

目 次

第2回助成研究報告会の開催	1
窒素固定細菌の種多様性解析ならびに窒素固定能の分子進化学的研究	川崎 浩子… 5
集団遺伝学的方法論を取り入れたビブリオ科細菌の再分類	澤辺 智雄…17
日本産ヒアロスキファ科菌類（盤菌綱・ビョウタケ目）の系統分類学的研究	細矢 剛…27
地衣類を構成する地衣菌および共生藻の分離培養保存と系統分類	山本 好和…41
南西諸島沿岸域からのプラシノ藻類を中心とした微細藻類の分離・培養と 系統分類学的研究	須田彰一郎…53
皮膚微生物フローラの菌叢解析と機能解析に基づく各種皮膚疾患治療法 開発への応用—真菌 <i>Malassezia</i> とアトピー性皮膚炎中心に—	杉田 隆…63
優れた生分解性共重合ポリエステルを高効率生産する微生物の分子育種	福居 俊昭…75

第2回助成研究報告会の開催

第2回助成研究報告会を平成20年6月10日千里ライフサイエンスセンター5階サイエンスホールに於いて開催した。今回は平成17～19年度に研究助成を受けた7名の研究者によって3年間に得られた研究成果が口頭発表された。本報告会には約100名の参加者があった。

報告会の開会に先立ち、森田桂理事長から「この研究助成が微生物研究の発展に少しでも寄与できれば有難く思う」旨の挨拶があり、続いて助成研究者による研究報告がおこなわれた。2つの研究課題のうち「微生物の分類学的研究および培養株の保存に関する研究(研究課題1)」については駒形和男評議員(東京大学名誉教授)の座長の下に、1. 窒素固定細菌の種多様性解析並びに窒素固定能の分子進化学的研究(川崎-中川浩子)、2. 集団遺伝学的方法論を取り入れたビブリオ科細菌の再分類(澤辺智雄)、3. 日本産ヒアロスキファ科菌類(盤菌綱・ビョウタケ目)の系統分類学的研究(細矢剛)、4. 地衣類を構成する地衣菌および共生藻の分離培養保存と系統分類(山本好和)、5. 南西諸島沿岸域からのプラシノ藻類を中心とした微細藻類の分離・培養と系統分類学的研究(須田彰一郎)の5題の発表があり、「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. 皮膚微生物フローラの菌相解析と機能解析に基づく各種皮膚疾患治療法開発への応用(杉田隆)、7. 優れた生分解性共重合ポリエステルを高効率生産する微生物の分子育種(福居俊昭)の2題の発表がおこなわれた。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題の研究報告のそれぞれについて活発な質疑応答ならびに議論がおこなわれ、大変有意義な報告会となった。本報告会は盛会ではあったが、若年層の参加が少なかったのが惜しまれる。今後、若手研究者に関心を持ってもらえるよう努力する必要がある。

報告会のあと懇親会が開催され、参加者の殆どが出席した。懇親会は、別府輝彦理事(東京大学名誉教授・日本大学教授)からの挨拶に続き、岡見吉郎理事(環境バイオ工学研究所所長)の発声で乾杯をして、立食式のパーティーが始められた。異なる分野で活躍されている微生物研究者の間で和やかに歓談がなされ、活発な交流が見られた。料理もお酒もふんだんにあり誠に盛会であった。この報告会と懇親会がいろいろな領域の微生物科学研究者の交流の場として大いに利用されることを願っている。

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する。

(文) 坂野 勲

RESEARCH COMMUNICATIONS



森田 桂 理事長



座長 駒形和男評議員



座長 豊島久真男評議員



中川 浩子氏



澤辺 智雄氏



細矢 剛氏



山本 好和氏



報告会

RESEARCH COMMUNICATIONS



須田彰一郎氏



杉田 隆氏



福居 俊昭氏



挨拶 別府輝彦理事



乾杯 岡見吉郎理事



懇親会

平成17年度研究助成の研究報告

助成期間：平成17年4月～平成20年3月

窒素固定細菌の種多様性解析ならびに 窒素固定能の分子進化学的研究

川崎 浩子

大阪大学生物工学国際交流センター

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

Studies on species diversity and molecular evolution of nitrogen fixing bacteria

Hiroko Kawasaki

International Center for Biotechnology, Osaka University

2-1, Yamadaoka, Suita-shi 565-0871, Osaka

Nitrogen fixing bacteria were isolated from root nodules of 32 wild legumes that abundantly grow in Okinawa, the southern subtropical part of Japan. Genetic diversity and taxonomic relationships among these rhizobia were studied by analyzing 16S rRNA gene, ITS, symbiotic genes and DNA-DNA relatedness values. The two strains of slow growing bacteria were identified as two new species, *Labrys okinawensis* and *Bradyrhizobium iriomotense*. The other five novel species candidates were suggested in this study.

In order to understand fully the unique nitrogen fixing bacteria heliobacteria, *nif* gene cluster from *Heliobacterium chlorum* DSM 3682^T was determined. The organization of the *nif* operon and the phylogeny of individual and concatenated gene products showed that the *H. chlorum nif* operon occupies an intermediate position between group I consisting of the aerobic diazotrophs and group II consisting of strictly anaerobic prokaryotes. The two *nifH* genes were present in the *H. chlorum nif* cluster, which required the switch-off of nitrogenase regulation in methanogenic archaea. These data show that the mechanism of nitrogenase inactivity between heliobacteria and purple bacteria is fundamentally different.

Finally the novel molecular analysis method was developed using whole genome sequences of *Rhizobiaceae* and *Phyllobacteriaceae*. Initially, orthologous pairs were isolated from all of the ORF genes by the pair wise alignment automatically. The similarity patterns were compared between orthologous pairs. Two or more evolutionally patterns of orthologous genes were clarified in the analysis of correlation coefficient of similarity. It showed that it is important to choose carefully the gene used for a molecular phylogenetic analysis such as multi locus sequence typing.

Key words: nitrogen fixing bacteria, *Bradyrhizobium*, *Heliobacterium*, whole genome analysis

緒言

窒素は我々を取り巻く地球環境上に窒素分子として大気の約79%を占めて存在している。しかし、我々動物や植物が利用できる窒素とは、アンモニアや硝酸のような還元型窒素であり、窒素が固定された状態にな

って初めて利用することができる。地球上の窒素固定は、Haber-Bosch法による工業的アンモニア合成と、稲妻放電、工場での高温燃焼、成層圏でのオゾン作用、地球内部からの噴出物のような自然現象等、そして窒素固定細菌による生物学的窒素固定によって行われている。工業的窒素固定と、自然現象等による非生物学的窒素固定は、年間約 85×10^6 トンと推定されている。一方、生物学的窒素固定は、地域によって異なるが、年間総固定量が約 175×10^6 トンと推定されている(中村, 1980)。生物学的窒素固定量は非生物学的窒素固定量の2倍以上であり、窒素固定生物が地球上の窒素固定に大きな役割を果たしているといえる。現在我々が抱えているエネルギー問題それに伴う食糧の持続的生

E-mail: kawasaki-hiroko@nife.go.jp

現) 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

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

共同研究者: 関 達治

(大阪大学生物工学国際交流センター)

Table 1 Slow-growing strains investigated in this study and their relevant information.

Strains	Identification	Host legume/plant	Geographic origin
KO3A	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3B	<i>B. japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3C	<i>B. japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3E	<i>B. japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3F	<i>B. japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3G	<i>B. japonicum</i>	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3D	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 1	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO3H	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 1	<i>Pueraria montana</i>	Iriomote island
KO5	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Pongamia pinnata</i>	Iriomote island
KO11	<i>B. elkanii</i>	<i>Pongamia pinnata</i>	Iriomote island
KO13	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 2	<i>Lespedeza cuneata</i>	Iriomote island
KO14	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 4	<i>Desmodium canum</i>	Iriomote island
KO19A	<i>B. elkanii</i>	<i>Acacia</i> sp.	Iriomote island
KO23	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 5	<i>Cassia surattensis</i>	Ishigaki island
KO20A	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	<i>Erythrina variegata</i>	Iriomote island
EKO5	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> sp. nov.	<i>Entada koshunensis</i>	Iriomote island
EPxn1	<i>B. japonicum</i>	<i>Entada koshunensis</i>	Iriomote island
MAFF210181	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov. candidate 3	<i>Canavalia</i> sp.	Ishigaki island
MAFF210190	<i>B. elkanii</i>	<i>Desmodium intortum</i>	Okinawa main island
MAFF210197	<i>B. japonicum</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Okinawa main island
MAFF210245	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	<i>Sesbania aegyptica</i>	Okinawa main island

ND, not determined

産・安定供給を考えたとき、生物学的窒素固定が人類に果たす役割は大きい。本研究では、生物学的窒素固定を行う細菌の基礎的知見を得ることを目的に、窒素固定量が高いマメ科植物の共生型窒素固定について、共生細菌の分離と同定を行い、種多様性について調査した。さらに、窒素固定能が高いとされているが、分離例が少なく、生態学的にも未知なグラム陽性有孢子光合成細菌について、窒素固定遺伝子を解析することにより、分子情報から窒素固定能について明らかにした。同時に、窒素固定細菌全体における窒素固定遺伝

子の分子進化について考察した。微生物の多様性評価には、分類学的考察は欠かせないと考えている。そこで、ゲノム時代を向かえた今、ゲノム情報を用いた窒素固定細菌の分類方法を検討し、現在の分類体系や分類方法との相関について考察した。

実験方法

根粒菌の分離と培養 沖縄に生育する32種類のマメ科植物の根粒より分離された50株の窒素固定細菌につ

Table 2 Fast growing strains investigated in this study.

Strains	Identification	Host plant
KO4-2B	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Ormocarpum cochinchinense</i>
KO6A	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Leucaena leucocephala</i>
KO12-1	<i>Ensifer</i> sp.	<i>Vigna reflexo-pilosa</i>
KO12A	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Vigna reflexo-pilosa</i>
Mu22	<i>Ensifer</i> sp.	<i>Mucuna</i> sp.
MgB2a	<i>Ensifer</i> sp.	<i>Mucuna gigantea</i>
MgB7b	<i>Ensifer</i> sp.	<i>Mucuna gigantea</i>
Mm(2)-1	<i>Ensifer</i> sp.	<i>Mucuna membranacea</i>
EP2n-2	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Entada phaseoloides</i>
H-4-B1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Entada parvifolia</i>
060826S-2	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>Mimosa</i> sp.
060826S-3	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>Mimosa</i> sp.
060825G-3	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Leucaena leucocephala</i>
060825H-2	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Canavalia cathartica</i>
060826N-1	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Canavalia cathartica</i>
060825J-1a	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Lespedeza</i> sp.
060826L-1	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Uraria crinita</i>
060826L-5	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Uraria crinita</i>
060826R-2	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>Indigofera zollingeriana</i>
060826R-4	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Indigofera zollingeriana</i>
MAFF210191	<i>Labrys okinawaensis</i> sp. nov.	<i>Entada phaseoloides</i>
MAFF210231	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Vigna marina</i>
MAFF210243	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Sesbania bispinosa</i>
MAFF210244	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Sesbania sesban</i>
MAFF210152	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Crotalaria juncea</i>
MAFF210253	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Dalbergia</i> sp.
MAFF210254	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Stylosanthes guianensis</i>
MAFF210255	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Vigna marina</i>
MAFF210256	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Neonotonia wightii</i>

いて種多様性研究を行った (Tables 1, 2). 50株のうち 37株については、沖縄の西表島と石垣島に生育するマメ科植物の根粒 (一部腫瘍) より新たに分離した. 13株については、農業生物資源研究所農業生物資源ジェンバンクより入手した.

採取した根粒からの微生物の分離は、以下に示す方

法で行った. 根粒表面を 70% エタノールで 2 分間殺菌し, 3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 分間浸漬させた. その後滅菌水で 10 回洗浄し, カミソリで根粒を切断し, 切断面が YMA 培地 (酵母エキス: 0.5 g, マンニトール: 10 g, K_2HPO_4 : 0.5 g, NaCl: 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 g /liter (pH 7.0)) の上に付着す

Table 3 Whole genome sequences used in this study.

Species and strain	Genome size (bp)	Number of CDS	Accession number
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 (Cereon)	5,673,465	5,301	NC 003062 – NC 003065
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 (U. Washington)	5,674,064	5,402	NC 003304 – NC 003306 / NC 00308
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	7,596,297	7,281	NC 002678 / NC 002679 / NC 002682
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	4,935,185	4,543	NC 008242 – NC 008244 / NC 008252
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	6,530,228	5,963	NC 007761 – NC 007766
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	7,751,309	7,150	NC 008378 – NC 008384
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	6,691,694	6,205	NC 003037 / NC 003078 / NC 003047

るように置いて7日間28℃で培養した。根粒の周りに生育してきた細胞を純粋分離し、供試株とした。

根粒菌の表現形質 新規と推定された微生物については、Gao *et al.* (2004) の方法に従い、炭素源資化性、窒素源の利用、抗生物質耐性能、NaCl 耐性、生育温度幅、その他通常細菌の同定に用いる生化学試験を行った。窒素固定試験は、Winogradsky's N₂-free mineral 培地 (Hashidoko *et al.*, 2002; Tchan & New, 1994) を使用した。マメ科植物への感染試験は、マメ科植物のモデル植物とされているサイラトロ (*Macroptilium atropurpureum*) を用いて行った。比較のために、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 を使用した。

分子系統解析方法 得られたすべての株について、16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。一部の細菌については、多遺伝子座配列型 (Mutlilocus sequence typing: MLST) 法による解析 (Vinuesa *et al.*, 2005) を行い、16S rRNA 遺伝子に加え、ハウスキーピング遺伝子として、16S-23S internal transcribed spacer (ITS 領域)、*atpD* 遺伝子、*glnII* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*gyrB* 遺伝子、植物との共生に関与する遺伝子として *nifH* 遺伝子、*nodC* 遺伝子を決定し、分子系統解析を行った。すべての遺伝子は PCR により増幅後、PCR 産物を精製し塩基配列を決定した。

G+C 含量測定と DNA-DNA 相同性試験 粗精製した DNA は、CsCl を用いた密度勾配分離法により精製し、Tamaoka & Komagata (1984) の方法に従い GC 含量を測定した。DNA-DNA 相同性試験は、フォトビオチンを用いたマイクロプレート法 (Ezaki *et al.*, 1989) によって行った。

ヘリオバクテリアの培養と窒素固定遺伝子の取得 *Heliobacterium chrorum* DSM 3682^T の窒素固定遺伝子を取得した。本株の培養には DSM medium 370 培地を用い、絶対嫌気性細菌であるため株の植え継ぎには嫌気チャンバーを使用し、4000-6000 lux の光を照射して培養した。窒素固定遺伝子の取得は、常法 (Sambrook *et al.*, 1989) に従い、すでに報告のあった *H. chrorum* の *nifH* 遺伝子配列を基にプローブを作製し、サザンハイブダイゼーション法により *nifH* 遺伝子を含む遺伝子を取得し、その後周辺の塩基配列をプライマーウオーキング法で読解する手法を用いた。得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、窒素固定遺伝子を推定した。さらにリアルタイム PCR 法を用いて、窒素の有無による遺伝子の発現解析を行った。窒素固定遺伝子の分子系統解析は、近隣結合法 (NJ 法) ならびに最尤法 (ML 法) を用いて解析した。

全ゲノム解析に使用した分子情報と解析方法 解析には、Table 3 に示した7つのゲノム情報を用いた。すべてのゲノム情報から全 ORF 領域を入手し、全組み合わせにおけるホモロジー検索を行った。ホモロジー検索には、BLAST ホモロジー検索を用いた。得られた相同値から、E-value < 0.1 であったものをオーソログ遺伝子であると仮定した。オーソログ遺伝子について、DNA 塩基配列とアミノ酸配列のデータセットを作製し、オーソログセット毎に相同値を算出した。あわせて、それぞれの遺伝子の情報 (DDBJ エントリー名、NCBI プロダクト名、遺伝子名、遺伝子タグ、カテゴリー名) を収集し、オーソログセット毎に情報を格納した。BioNumerics 4.6 (Applied Math NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) を用いて、遺伝子間の相同値を求め、遺伝子の相同値傾向の相関性を、相関係数によって表し、それを比較することで遺伝子の分子進化パターン

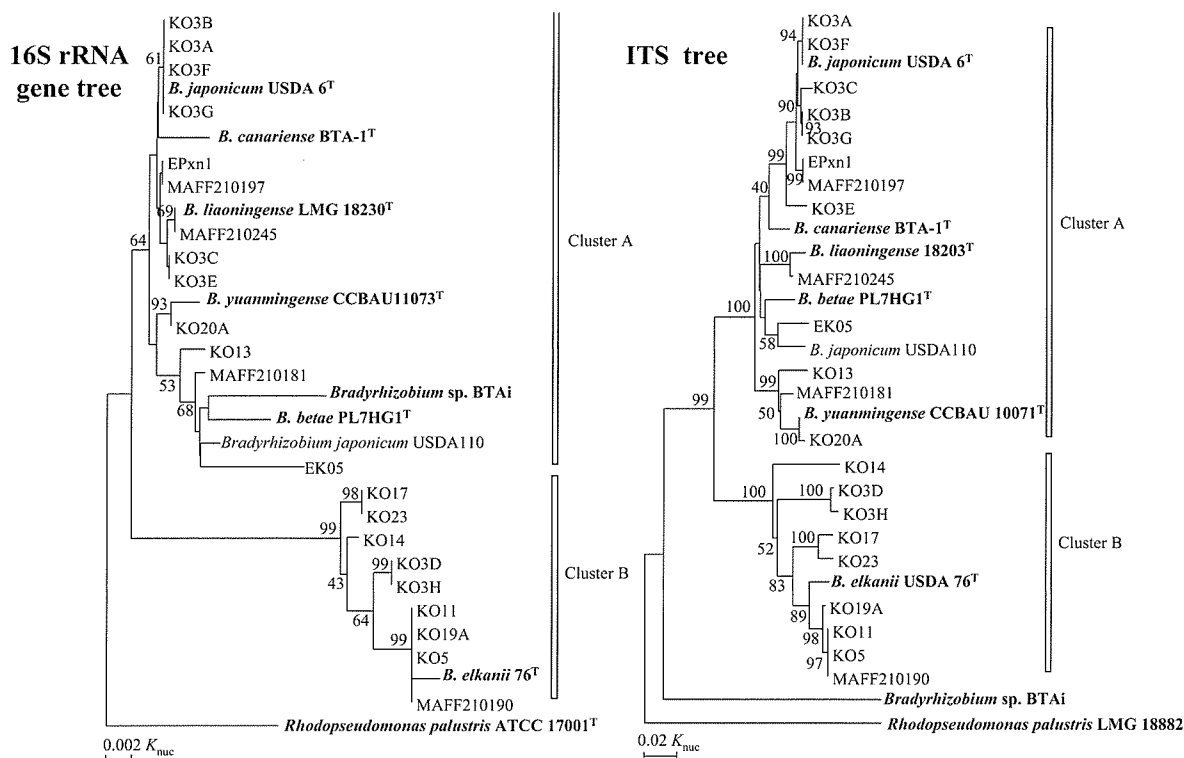


Fig. 1 Phylogenetic trees based on the 16S rDNA (1395 bp) and ITS (16S-23S rDNA) (645 bp) sequences. The trees were constructed using the neighbor-joining method with K2P distance correction model and 1000 bootstrap replications. Bootstrap values are indicated by percentages at nodes. Numbers at bars indicate substitutions/site.

を解析した。

結果と考察

沖縄マメ科植物の根粒より分離された共生型窒素固定細菌の多様性 沖縄は日本の南端に位置し、特に西表島一帯及び石垣島の一部は西表石垣国立公園に指定されており、マングローブ林が広がり、貴重な動植物も多い。沖縄県全体が亜熱帯性気候から熱帯性気候であり、西表島、石垣島は、熱帯雨林気候である。多数の野生マメ科植物、帰化植物も多く生育しているが、共生型窒素固定細菌の研究はほとんどなされていなかった。我々は1999年よりこれまで、マメ科植物の根粒や根圏からマメ科植物に共生する細菌を分離してきた。本研究で使用した株を Table 1 と Table 2 に示した。生育の早い株 (Table 2) については、16S rRNA 遺伝子塩基配列による解析を行い、属レベルの同定を行った。その結果、分離された細菌種は多様であり、宿主植物が異なれば分離される細菌も異なっている可能性が高いことが示された。

本研究では、特に生育が遅い窒素固定細菌に注目し、

その分類学的諸性質を調べると同時に、宿主である沖縄のマメ科植物とそれに共生する細菌の共生関係を調べ、根粒菌の多様性を調査した。16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析を行った結果、分離株は、*Bradyrhizobium elkanii* のグループ (クラスター B) とそれ以外の種で構成されるグループ (クラスター A) に分かれ、沖縄のマメ科植物から分離された株は、MAFF 210191 を除いて、すべて両クラスターに属していた (Fig. 1)。*Bradyrhizobium* 属の種レベルの分類指標として有効であることが報告 (Willems *et al.*, 2003) されている ITS 領域を用いた分子系統解析を行ったところ、16S rRNA 遺伝子の系統樹とほぼ同様の結果が得られ、新種と思われるいくつかの株が見出された。独立した系統枝から代表株 8 株 (KO3D, KO3H, KO13, MAFF 210181, KO17, KO23, KO14, EK05) を選抜し、既知種との DNA-DNA 相同性試験を行ったところ、*Bradyrhizobium* 属の 6 新種の可能性が示唆された (Table 1)。またこれらの共生遺伝子である *nifH* 遺伝子と *nodC* 遺伝子について解析を行ったところ新規の塩基配列を有していた。タイワンクズの同一個体の異なる複数の根粒より分離した根粒菌 (KO3A-KO3H)

は、2種類の *Bradyrhizobium* 種に同定され、一種は既知種 *B. japonicum* であったが、もう一種は新規微生物種であった。同一個体に異なる菌種がそれぞれ根粒を形成していることがわかった。

これまで分離の対象とされてこなかった宿主植物種から根粒菌を分離した結果、新規な微生物種が数多く見出された。本研究では沖縄のマメ科植物に注目したが、日本各地には多種多様なマメ科植物が分布しており、そこには未知の共生微生物が存在している可能性が大いに期待される。

モダマから分離した新規の根粒形成細菌 *Entada* (モダマ) は、アジアからアフリカの亜熱帯、熱帯地域に広く分布しており、日本では屋久島から八重山諸島に生育していることが知られている。世界最大の蔓性のマメ科植物で、一本の親株は数十メートルも蔓を伸ばし、山を被うほどの繁殖力がある。蔓の直系は30 cm、莢は80~120 cm と長く、中には直径5 cmの種子が複数入っている。本調査で、屋久島と西表島のモダマの生育が確認された。屋久島のモダマは *Entada phaseoloides* であり、西表島のモダマは *Entada kosuensis* であった。両者について根粒菌の分離を試みた。屋久島に生育していた *Entada phaseoloides* の若い苗から根粒と腫瘍根を採取し微生物を分離したところ、分離された株はすべて *Burkholderia* 属であった。*Burkholderia* 属には、*Rhizobium* 型の根粒形成遺伝子が水平移動したと思われる細菌が報告されていたため、分離株について共生遺伝子の検出を試みたが検出されず、窒素固定細菌ではない可能性が考えられた。

また、沖縄のモダマ (*Entada phaseoloides*) より分離されたと記録されていた MAFF 210191 について同定試験を行ったところ、*Labrys* 属の新規微生物であることが明らかとなり、東北大学の圃場の土壌より分離されていた株を加え、*Labrys* 属の2新種 (*Labrys okinawensis* & *Labrys miyagiensis*) を報告した (Islam *et al.*, 2007)。MAFF 210191 は沖縄のモダマの一種である *Entada phaseoloides* の根粒より分離されたと記録されていたが、マメ科のモデル植物であるサイラトロ (*Macroptilium atropurpureum*) を用いた感染試験において、根粒形成は認められなかった。また植物との共生に関与する遺伝子 *nifH* 遺伝子と *nodC* 遺伝子についても検出できなかった。しかし、 N_2 源を加えない培地において生育が観察された。光合成を行う *Bradyrhizobium* に非常に近縁な植物共生菌において、*nod* 遺伝子がなかったという報告があることから (Giraud *et al.*, 2007)、MAFF 21091 が新規の共生系を持っている可能性もわずかながら残されている。

西表島に生育する *Entada kosuensis* の根粒と腫瘍根から、根粒形成菌を分離することができた。典型的な根粒からは、*B. japonicum* EPxn1 株が分離された。*E. kosuensis* の根には典型的な根粒とは異なる腫瘍のような固まりが存在しており、そこから分離した EK05 は、16S rRNA 遺伝子塩基配列の結果から新種であることが示唆されたため、常法に従い同定試験を行った。Fig. 1 に示したように、*Bradyrhizobium* 属の種分類に有効な ITS 領域に基づく分子系統解析 (Willems *et al.*, 2003) の結果をもとに DNA-DNA 相同性試験を行い、さらに Multilocus sequence typing

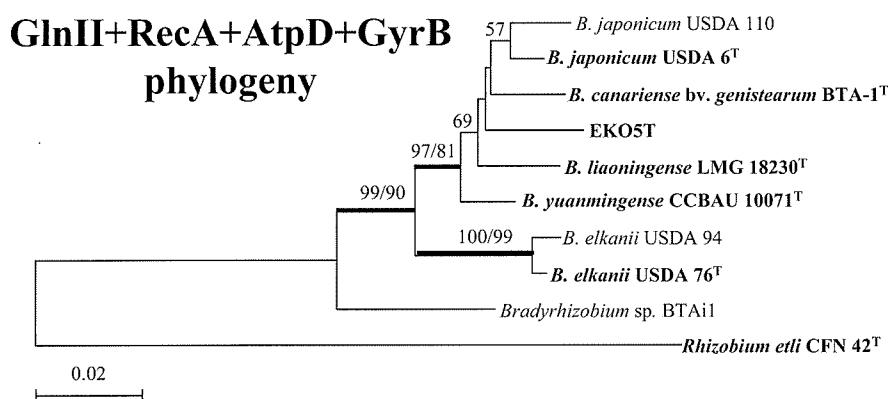


Fig. 2 *Bradyrhizobium* species phylogeny inferred from partially congruent GlnII+RecA+AtpD+GyrB amino acid sequence partitions. The NJ tree was constructed using Poisson correction distance model in MEGA v.3.1 software package. Numbers at nodes indicate percentage bootstrap values from 1000 replications. Only values (NJ/MP) above 50 percent are indicated; values greater than 70% are shown in bold lines. Bar, 0.02 substitutions per site.

(MLST) 法を用いて、EK05 株の新規性を明らかにした。6つのハウスキーピング遺伝子 (*rrs*, ITS region, *atpD*, *glnII*, *gyrB* and *recA*) と2つの共生に関与する遺伝子 (*nifH* and *nifD*) の塩基配列を決定した。DNA-DNA 相同性試験の結果、EK05 株は *B. betae* と *B. canariense* に対し相同値 50-61% という中間的な値を示したが、MLST 解析では、既知種とはクラスターを形成せず、独立した分類群であることが示唆された。4つのハウスキーピング遺伝子を合わせた系統解析においても (Fig. 2), 明らかに既知種とは異なり、新規微生物であることが示唆された。表現形質においても、*Bradyrhizobium* 属の他の種と区別することができ、新種 *Bradyrhizobium iriomotense* として提案した (Islam et al., 2008)。

モダマの種子を用いた感染試験は非常に困難なことから、マメ科のモデル植物であるサイラトロを用いた感染試験を行った。その結果、*B. iriomotense* EK05 株は3週間で根粒を形成した。比較株として使用した *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 では、根粒形成を確認するのに5-6週を要したことを考えると、EK05 株の根粒形成のスピードが極めて早いことがわかる。今後はそのメカニズムの解明に興味を持たれるところである。

ヘリオバクテリアの窒素固定遺伝子の分子系統学的位置
ヘリオバクテリアはグラム陽性の孢子形成の光

合成細菌という非常にユニークな性質を持った細菌である。1983年に *Heliobacterium* 属の最初の種として *Heliobacterium chlorum* が報告された (Gest & Favinger, 1983)。本種は絶対嫌気性の細菌で、バクテリアオクロフィル *g* という他の生物には見られない光合成色素を有している。分類学的には、*Bacillus* 属や *Clostridium* 属のような GC 含量が低い孢子形成細菌に近縁な細菌である。ヘリオバクテリアはその多くが水田土壌より分離されており、主な生育地は水田ではないかと考えられているが、未だその生態は明らかにされていない。

ヘリオバクテリアの窒素固定能はすでに知られており、同じく光合成細菌であるグラム陰性の紅色非イオウ細菌 *Rhodobacter capsulatus* に比べて高い窒素固定能を有していることが報告されている (Kimble & Madigan, 1992)。本研究では、*Heliobacterium chlorum* の *nif* クラスターを決定し、他の窒素固定細菌の窒素固定遺伝子と比較することで、窒素固定能の進化について知見を得ようと試みた。サザンハイブリダイゼーション解析と塩基配列決定法により、11の ORF 領域の存在を明らかにすることができた (Fig. 3)。

他の嫌気性窒素固定細菌、嫌気性の窒素固定古細菌、ならびに好気性窒素固定細菌と比較すると、*Heliobacterium chlorum* の *nif* クラスターは嫌気性細菌と非常に類似し、好気性細菌に比べ遺伝子の数が少ないことが明らかとなった。主要な窒素固定遺伝子群を

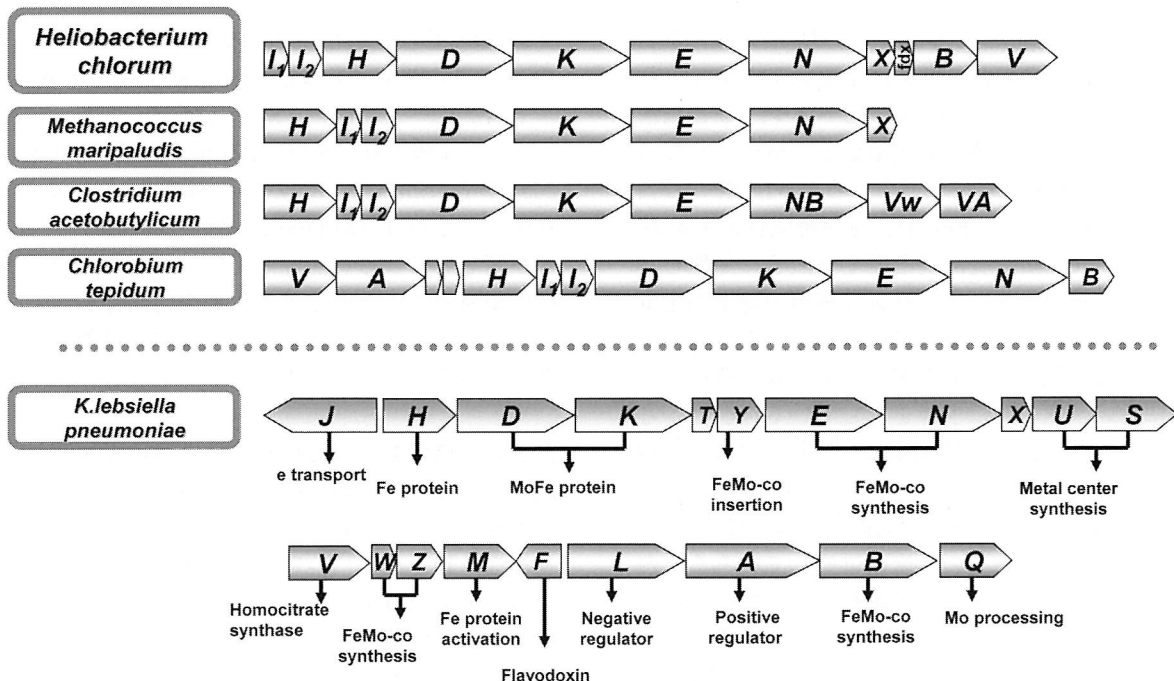
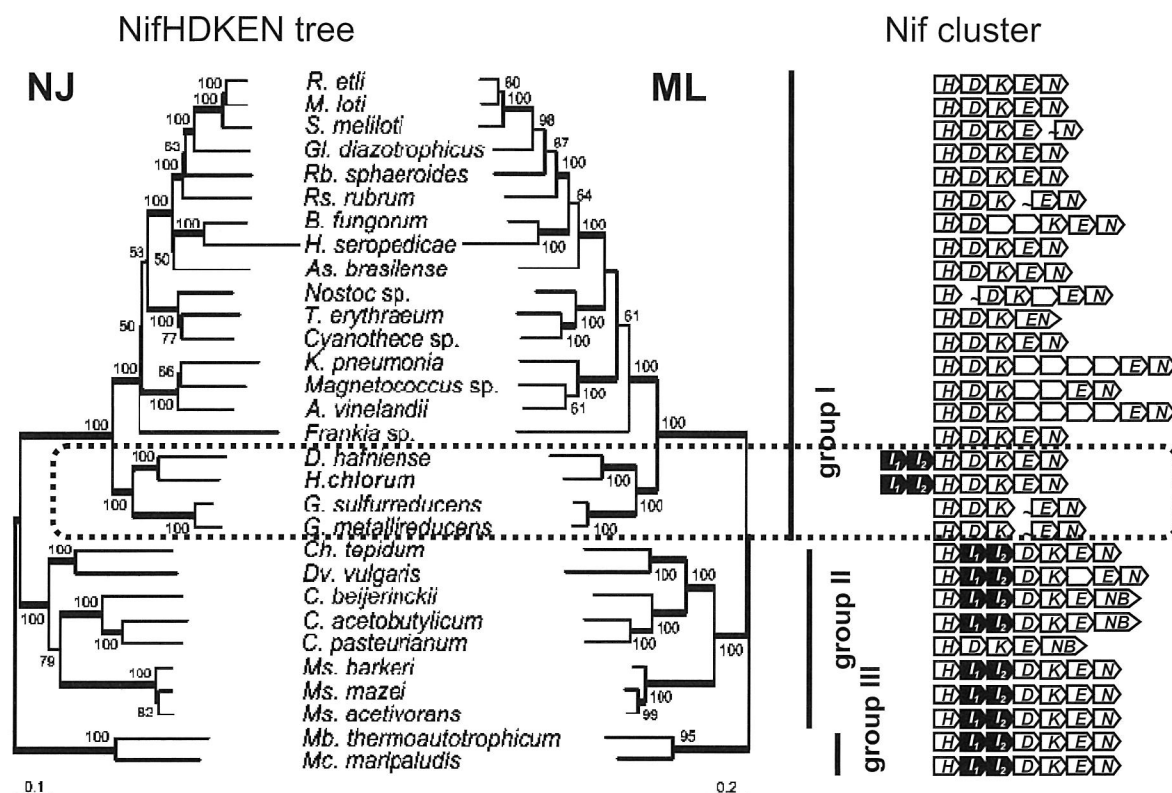


Fig. 3 Comparison of the *nif* cluster in representative of the nitrogenase groups.



用いて系統解析を行ったところ、*Heliobacterium chlorum* は、好気性細菌の窒素固定遺伝子で構成される group I に属し、*Clostridium* 属とメタン生成古細菌のような嫌気系細菌の窒素固定遺伝子で構成されている group II や古細菌だけで構成される group III には属さないことがわかった (Fig. 4)。絶対嫌気性細菌の *H. chlorum* が好気性細菌型の窒素固定遺伝子に類似しており、また系統樹において、好気性細菌の窒素固定遺伝子の系統の根元から分岐していることから、ヘリオバクテリアは進化的に好気性細菌の窒素固定遺伝子の祖先型に近い状態の遺伝子群を有している可能性が考えられる。さらに、嫌気性細菌にしか見られない *nifl* 遺伝子と主要窒素固定遺伝子の構成を比較したところ、*H. chlorum* は他の嫌気性窒素固定細菌とは異なり、*nifl* 遺伝子が *nifHDKEN* の上流に位置していることが明らかとなった (Fig. 4)。分子系統学的には、好気性細菌に近く、*nifl* の存在という点においては嫌気性細菌に近い (遺伝子構成は若干異なる) という点で、窒素固定に関して、*H. chlorum* は好気性窒素固定細菌

と嫌気性窒素固定細菌の中間型であると推測された。メタン生成窒素固定細菌における *nifl* 遺伝子は、ニトロゲナーゼ活性の ‘Switch-off’ システムに関与することが示唆されており (Kessler *et al.*, 2001 & Leigh, 2004), *H. chlorum* においても Switch-off システムが存在することから (Kimble & Madigan, 1992), *nifl* 遺伝子が関与している可能性が高い。しかし、その遺伝子構成が異なることやその他生理学的諸性質から、新しいニトロゲナーゼ調節機構が存在する可能性があると考えている。

全ゲノム情報を用いた根粒菌の新しい微生物分類法の試み 従来の分類学的手法を用いて、窒素固定細菌の多様性について考察してきた。また、窒素固定能の多様性を知るために、窒素固定遺伝子群が未知であったユニークな特徴を持つヘリオバクテリア細菌について、窒素固定遺伝子クラスターを決定し、他の窒素固定細菌との比較解析を行った。しかし、これらの解析方法は、ゲノム全体から見れば、一部の情報を見てい

るにすぎない。ゲノム時代を迎え、多くのゲノム情報が入手できるようになった現在、ゲノム情報を用いて微生物の分類ができるのではないかと考えた。窒素固定細菌についてもゲノム情報が公開されており、今回、窒素固定細菌 *Rhizobiaceae* と *Phyllobacteriaceae* についてゲノム情報を用いた比較解析を試みた。

7つのゲノムデータ (Table 3) からすべての ORF 領域を抽出し、すべての組み合わせで BLAST 相同性検索を行った。BLAST 検索の結果、E-value < 0.1 という閾値を設け、条件を満たすものをオーソログと仮定した。仮定したオーソログ遺伝子間の相同性の傾向を、二つのゲノム間における ORF 遺伝子数をグラフに示すことで、相同性の傾向を見ることとした (Fig. 5)。色の薄い方のグラフは染色体遺伝子上の ORF 領域のみの相同値検索結果で、色の濃いグラフは共生プラスミドを含んだ相同値検索結果を示している。同一由来株である *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Cereon) と *A. tumefaciens* C58 (U. Washington) のオーソログ遺伝子の相同性は、そのほとんどが 100% であった。*Rhizobium etli* CFN 42 と *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 の間では、相同性のピークが 85-95% であった。同じく、同属別種の間では *Mesorhizobium loti* MAFF303099 と *Mesorhizobium* sp. BNC1 の相同値

の傾向は、*Rhizobium* 属の異なる 2 種間の関係とは異なり、70-80% にそのピークがあった。別属である *Mesorhizobium* sp. BNC1 と *S. meliloti* 1021 の間では、65-75% にそのピークがあった。すべてのゲノム間の相同値パターンで、45% 付近にも相同値のピークが見られた。これはその後のランダム塩基配列の相同値検索から、偶然に E value < 0.1 となった遺伝子の組み合わせによって得られたピークであることが予想されたため、オーソログ遺伝子の抽出に用いた閾値 E-value < 0.1 の見直しが必要であることが示唆された。

オーソログ遺伝子として抽出されてきた遺伝子の内、相同値 50% 以下はオーソログ遺伝子ではない可能性が示されたことから、ゲノム解析には相同値 50% 以上を使用することにした。相同値 50% 以上の遺伝子の傾向を見たとき、分類群の関係と一致することがわかった。例えば、同種であれば、95% 以上の相同値を示す遺伝子がほとんどである。今回は、株の由来が同一である二つのゲノムデータを使用したため、ほぼ 100% になったが、他の分類群で検証する必要がある。次に、同属内の異なる種間のゲノム相同値は、85-95% にそのピークが存在すると思われる。今回、*Mesorhizobium* 属の異なる 2 種を比較したが、*Rhizobium* 属ほど高い値は得られなかった。このこと

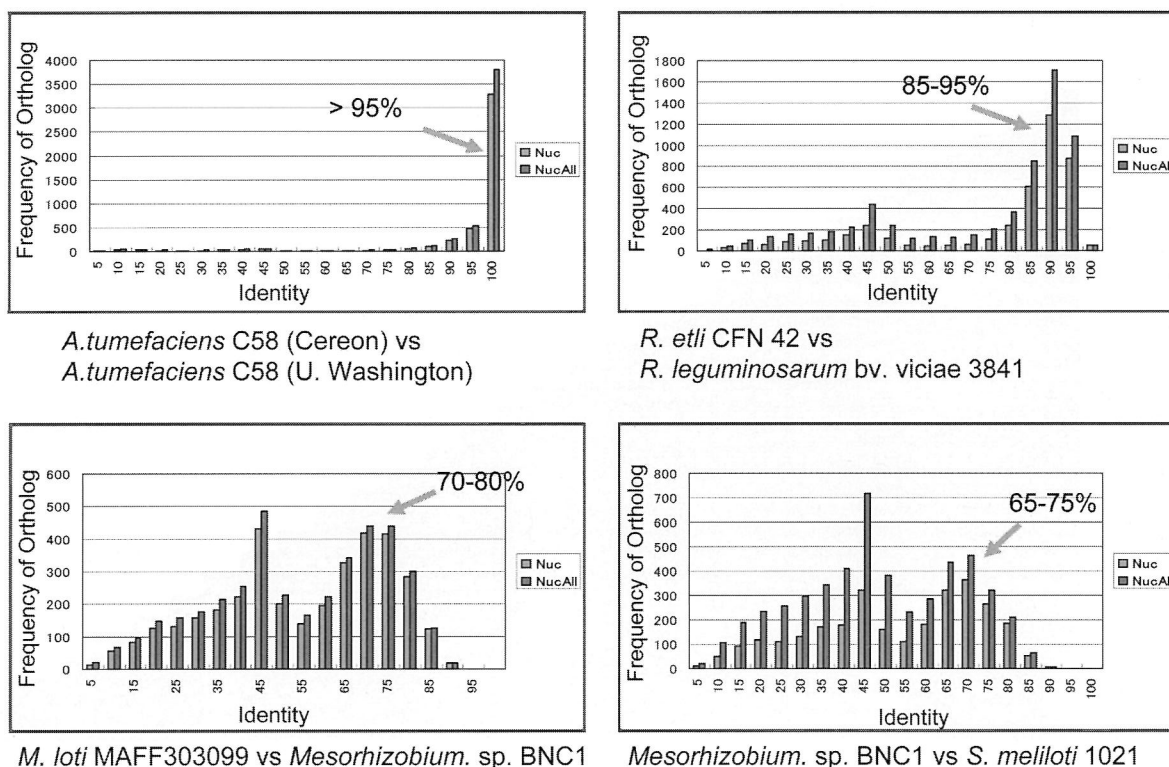


Fig. 5 Similarity distribution of nucleotide sequences comparison by pairwise alignment.

は, *Mesorhizobium* 属の2種間の16S rRNA遺伝子の塩基配列の相同値が低いことと一致する. 今後 *Mesorhizobium* sp. BNCI の分類学的検討が必要であると考える. 次に異なる属の間の関係では, ゲノム相同値は65-75%にあるという傾向が得られた. 現在種分類に用いられる DNA-DNA 相同性の比較のように, ゲノム時代においては, 属レベル, 種レベルの分類に, ゲノムの全オーソログ遺伝子の相同性解析が有効になる

と期待される.

次に, カテゴリー毎に遺伝子とアミノ酸情報を比較した. 比較方法は, 7つのゲノム情報をもとに, E-value < 0.1 でオーソログ遺伝子と推定された中から, 相同値50%以上を抽出し, 同じオーソログ遺伝子毎にアライメント解析を行い, 相同値 (Identity) を求めた. すべての遺伝子において, 二つの遺伝子間の相関性を BioNumerics 4.6 を用いて相関係数として算出した.

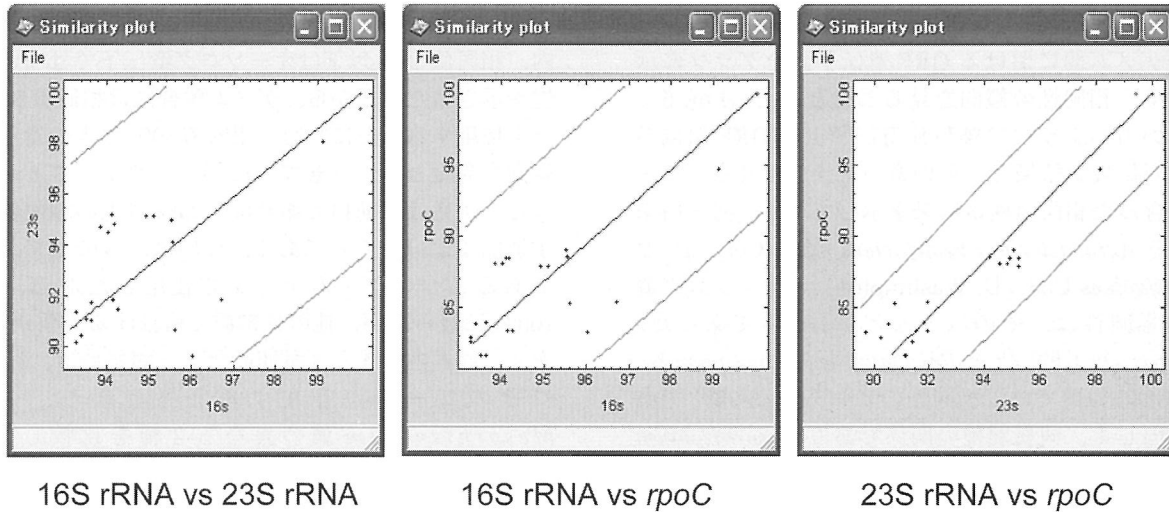


Fig. 6 The correlation coefficient of similarity of genes, 16S rDNA-23S rDNA, 16S rDNA-*rpoC* and 23SrRNA-*rpoC*, using Pearson product-moment correlation coefficient.

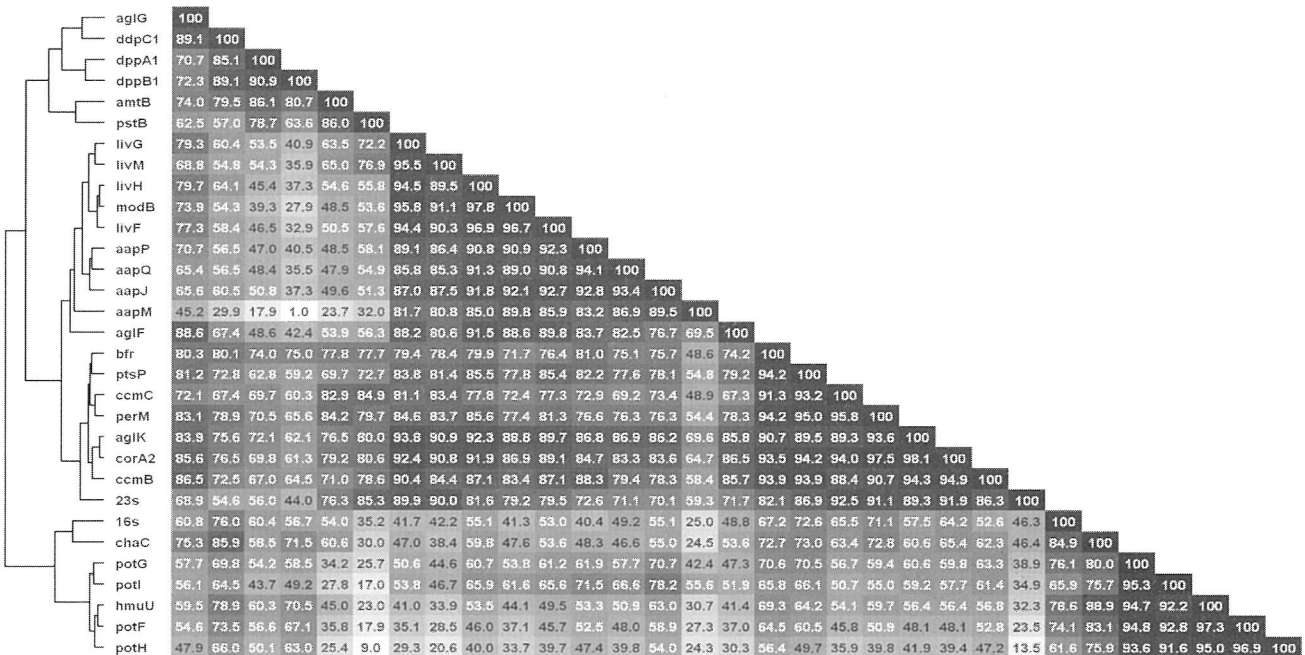


Fig. 7 Matrix analysis using correlation coefficient in the orthologous group, "transport and binding proteins" category.

Fig. 6 に二つの遺伝子の相同値分布の解析例を示した。7つのゲノムから得られた全組み合わせの16S rRNA 遺伝子の相同値をX軸に、23S rRNA 遺伝子の相同値をY軸に示した。もし、二つの遺伝子の相同性の傾向に相関があれば、相関係数1に限りなく近づくと考えられる。16S rRNA 遺伝子と23S rRNA 遺伝子と *rpoC* 遺伝子と比較したところ、23S rRNA 遺伝子の相同性の傾向は、16S rRNA 遺伝子よりも *rpoC* 遺伝子の相同性の傾向に近いことがわかった。この解析をすべての遺伝子で行った。カテゴリー毎に相同性の相関係数マトリクスを作製した (Fig. 7)。相関係数マトリクスに基づき、遺伝子の進化の傾向を示したのが、Fig. 7 の左に示したデンドログラムである。この結果から、相同性の傾向には、いくつかの進化パターンがあることが判明した。すなわち、系統関係において、遺伝子毎に近縁関係が異なることを示している。分子系統解析を行う際、偏ったグループより抽出された遺伝子を用いて系統解析をすると、偏った分子系統の結果が導かれるということを示している。今後は、このような相同性の傾向の異なる遺伝子をいかに解析し、微生物の分類体系を構築するかについては、さらなる解析方法の開発が必要であると思われる。現在広く普及しつつある MLST 解析において、偏った結果を導き出さないために、遺伝子の進化の傾向を考慮して解析分子を選抜するべきであるということも示唆された。

要 約

本研究は、窒素固定細菌の種多様性解析と分子進化を明らかにするために、沖縄のマメ科植物の共生細菌の分離と同定、窒素固定遺伝子の分子進化解析、そして新しい分類学手法の解析方法を検討したものである。まず、沖縄のマメ科植物の共生型窒素固定細菌について、その多様性を示すことができた。根粒菌の解析が進んでいないマメ科植物には、新規共生型窒素固定細菌が存在する可能性が示唆された。次に、窒素固定は窒素固定遺伝子によって制御されており、窒素固定遺伝子を分子レベルで解析することによって、窒素固定能の多様性と分子進化について考察した。グラム陽性光合成窒素固定細菌であるヘリオバクテリアの窒素固定遺伝子群を遺伝子レベルで明らかにし、その分子進化学的解析から、ヘリオバクテリアは嫌気細菌にも拘わらず、好気性細菌型の窒素固定遺伝子を有していることがわかった。しかしその遺伝子構成は、絶対嫌気性細菌型であり、ヘリオバクテリアの窒素固定遺伝子は好気性と嫌気性細菌の中間型であると推測される。ゲノム時代において、根粒形成菌のゲノム情報を

用いた一連の比較解析方法を作成した。機械的に推定オーソログ遺伝子を抽出し、相同値検索を行うツールを作成した。遺伝子間の相同性傾向の比較解析を行い、遺伝子毎に進化傾向が異なることを明らかにした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Enkh-Amgalan, J., Kawasaki, H. & Seki, T. (2005). The *nif* gene cluster in the gram-positive phototrophic bacterium *Heliobacterium chlorum*: implications of *nifI*₁ and *nifI*₂ genes for the nitrogenase evolution. 2005年度日本農芸化学会大会 (東京).
- 2) Islam, M. S., Kawasaki, H. & Seki, T. (2005). *Labrys okinawaensis* sp. nov., a plant root associated bacterium isolated from *Entada phaeoloides*. 日本微生物資源学会第12回大会 (千葉).
- 3) Khiev, P., 山根大介, Panbangred, W., 川崎浩子, 関達治 (2005). タイ王国より分離した Free-living 窒素固定細菌の分類学的研究. 第25回日本微生物系統分類研究会年次大会 (東京).
- 4) 森下康行, 川崎浩子, 藤山和仁, 南澤 究, 関 達治 (2006). *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 におけるジベレリン合成関連遺伝子の機能解析. 2006年度日本農芸化学大会 (京都).
- 5) 磯山 (田中) 純子, 川崎浩子, 関 達治 (2006). 系統分類と分子情報の融合 - ゲノム公開 *Rhizobiaceae* の分子情報解析 -. 第26回日本微生物系統分類研究会年次大会 (岐阜).
- 6) 磯山純子, 川崎浩子, 関 達治 (2007). 全ゲノム情報を用いた新しい細菌分類の試み. 2007年度日本農芸化学会大会 (東京).
- 7) Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. (2007). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume *Entada kosunensis* from Iriomote Island in Japan. 日本微生物資源学会第14回大会 (北海道).

原著論文

- 1) Enkh-Amgalan, Kawasaki, H. & Seki, T. (2006). Molecular evolution of the *nif* gene cluster carrying *nifI*₁ and *nifI*₂ genes in the Gram-positive phototrophic bacterium *Heliobacterium chlorum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 65-74.
- 2) Enkh-Amgalan, Kawasaki, H. & Seki, T. (2006). Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. Arch. Microbiol. **186**: 327-37.
- 3) Islam, M. S., Kawasaki, H., Nakagawa, Y., Hattori, T. & Seki, T. (2007). *Labrys okinawensis* sp. nov. and *Labrys miyagiensis* sp. nov., budding bacteria isolated from rhizosphere habitats in Japan, and emended descriptions of the genus *Labrys* and *Labrys monachus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**:

552-557.

- 4) Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. (2008).

Bradyrhizobium iriomotense sp. nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem, **72**: 1416-1429.

保存機関に寄託した菌株

Labrys miyagiensis NBRC 101365^T, NBRC 101366

Bradyrhizobium iriomotense NBRC 102520^T

その他 *Bradyrhizobium* 属16株, *Rhizobium* 属22株 :
NBRC に登録準備中

謝 辞

本研究に対し, 3年間研究助成を頂いた財団法人発酵研究所に感謝申し上げます。本研究の一部は, 大学院生であった Muhammad Saiful Islam 博士と Jigjiddorj Enkh-Amgalan 博士の学位論文の研究として行われました。全ゲノム解析については, 磯山純子博士, (財)蛋白質研究所磯山正治氏との共同研究によるものであります。

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.
- Gao, J.-L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H., Gu, J., Terefework, Z., Young, J. P. W., Lindstrom, K. & Chen, W. X. (2004). *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 2003-2012.
- Gest, H. & Favinger, J. L. (1983) *Helio bacterium chlorum*, an anoxygenic brownish-green photosynthetic bacterium containing a "new" form of bacteriochlorophyll. Arch. Microbiol. **136**: 11-16.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C. & Sadowsky, M. (2007). Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. Science **316**: 1307-1312.
- Hashidoko, Y., Tada, M., Osaki, M. & Tahara, S. (2002). Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associating, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizoplane of plants. Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**: 2259-2263.
- Islam, M. S., Kawasaki, H., Nakagawa, Y., Hattori, T. & Seki, T. (2007). *Labrys okinawensis* sp. nov. and *Labrys miyagiensis* sp. nov., budding bacteria isolated from rhizosphere habitats in Japan, and emended descriptions of the genus *Labrys* and *Labrys monachus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 552-557.
- Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem, **72**: 1416-1429.
- Kessler, P. S., Daniel, C. & Leigh, J. A. (2001). Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: Mechanistic feature and requirement for the novel GlnB homologues, NifI₁ and NifI₂. J. Bacteriol. **183**: 882-889.
- Kimble, L. K. & Madigan, M. T. (1992). Nitrogen fixing and the nitrogen metabolism in heliobacteria. Arch. Microbiol. **158**: 155-161.
- Leigh, J. A. (2004). Regulation of nitrogen fixing in methanogenic archaea, In: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J. R., Newton, W. E. (eds.), *Genetics and regulation of nitrogen fixing in free-living bacteria*. pp 65-71. Kluwer Academic Publishers.
- 中村道徳 (1980). 1. 2 地球上での窒素循環, 中村道徳 (編), 生物窒素固定, p.5-11, 学会出版センター, 東京.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. Lett. **25**: 125-128.
- Tchan, Y.-T. & New, P. B. (1984). Genus 1. *Azotobacter Beijerinck* 1901, 567^{AL}. In: Krieg, N. R. & Holt, J. G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 2, pp. 220-229. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Werner, D. & Martinez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 569-575.
- Willems, A., Munive, A., de Lajudie, P. & Gillis, M. (2003). In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. Syst. Appl. Microbiol. **26**: 203-210.

集団遺伝学的方法論を取り入れたビブリオ科細菌の再分類

澤 辺 智 雄

北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野

〒041-8611 函館市港町3-1-1

Reclassification of *Vibrionaceae* based on population genetical approach

Tomoo Sawabe

Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,

Minato-cho 3-1-1, Hakodate 041-8611, Japan

In the genome era, massive genome analysis of microbes and assessment of microbial diversity revealed many aspects of unexpected features on genome structure of bacteria. Based on the new finding on bacterial genomes, extending arguments on "What is bacterial species?" are emerged. Multilocus sequencing analysis (MLSA) is a powerful tool for understanding epidemiology, population structure and speciation process, even in the evolution of bacterial species. We applied the MLSA approach for *Vibrionaceae*, which is one of the best studied group of marine bacteria, to understand evolutionary processes following to further classification of the vibrios. In this study, the first broad analyses of vibrios using a set of nine housekeeping genes were established. Splits decomposition analysis based on 9-gene-MLSA disclosed at least 14 distinct clades. Some clades correspond the groups of species with similar genomes and ecological niches, suggesting a clear link between genome evolution and ecology. The common ancestor of *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, and *Grimontia* occurred 580 to 620 Myr ago, corresponding to the era of Cambrian explosion. Speciation process on *Vibrio harveyi* group was also analyzed by means of MLSA.

Key words: *Vibrionaceae*, population genetics, MLSA, evolution, reclassification

緒 言

生物のゲノム解析が進み、ゲノム構造から見る細菌の遺伝学的な特徴が次々と明らかになっている。細菌においても、遺伝子水平伝播の多さ、コア遺伝子群と補助遺伝子群の存在、株間の遺伝子配列の相違などの、ゲノム構造に高い柔軟性があること、そして、細菌では少ないとされていた相同組換えが予想以上に高い頻度で行なわれていることが明らかになった (Papke *et*

al., 2007; Doolittle & Pape, 2006, Nesbo *et al.*, 2006)。このことは細菌系統分類学にも大きな影響を与え、細菌における「種」とはいったい何なのか? という議論が再び活発化している (Gevers *et al.*, 2005; Hanage *et al.*, 2005; Buckley & Roberts, 2006; Doolittle & Papke, 2006; Hanage *et al.*, 2006; Spratt *et al.*, 2006)。

細菌系統分類学においても、「種」を定義することは最大の目的であり、その基準に「進化」という時間軸を置くことが理想的である。しかし、化石がほとんど残らない細菌では、進化の時間軸を置きながら分類を進めることは困難を伴うことから、これは大きな挑戦である。20世紀末から、分子系統解析を始めとする科学的手法が進展し、細菌の系統分類学は新しい時代に入った。また、21世紀に入ると、分子データの集積速度が増したため、今まで提案されてきた細菌の「種」に対しても、より多くの株を用いて種内の集団構造を解析し、近縁な種との比較を行なって、種分化や進化の過程を描き出すことに挑戦できるようになってきている (Urwin & Maiden, 2003)。

E-mail: sawabe@fish.hokudai.ac.jp

共同研究者: 木暮一啓, 和田実, 塚本久美子 (東京大学海洋研究所), 田島研一 (北海道大学大学院水産科学研究院), Fabiano L. Thompson (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil), Bruno Gomez-Gil (Collection of Aquacultural Important Microorganisms (CAID), Mazatlan Unit for Aquaculture, Mexico), Jeremy Carson (Department of Primary Industries, Water & Environment, Australia), Victor D. Vacquier (Scripps Institution of Oceanography, USA), Sudha Nair (Swaminathan Research Foundation, India)

細菌の「種」の定義に、大きな影響を及ぼしている細菌の種分化の概念として、「Biological species concept」と「Ecotype concept」がある (Doolittle & Papke, 2006) (Fig. 1 (A)). 前者は E. Mayr が提案した真核生物の種の概念を細菌に拡張したもので、相同組換えが種分化を抑制する力として働くとして説明されている。後者は F. M. Cohan が提案したもので、点突然変異を起こした個体が生息環境の栄養や物理化学的な要因で度重なる選択を受けること (周期的な選択) によって淘汰され、異なる環境下で種分化が進むという考え方である。いずれの種分化の概念も、多くの株を用いたゲノム解析を進めることで、細菌の種分化がどちらかの概念にフィットするのか、あるいは両方が混在しているのか、また、あるいはこれらとは全く異なる複雑な生物学的な機構があるのか、を検証できるようになる。しかし、例えば 100 株に及ぶ菌株をほぼ同時

にゲノム解析することは、経済的側面だけではなく、膨大な遺伝情報を処理する能力が律速となり、現実的に行なうことは難しい。

細菌の種分化機構の解析では、ゲノム解析に代わる方法として、様々な集団遺伝学的解析法が適用できる。この中で、Maiden のグループが考案した多遺伝子座配列解析 (Multi-locus sequence analysis: MLSA (当初は Multi-locus sequence typing と呼ばれていた)) は、4-11 のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定し、これに基づいて細菌の個体識別を行なう方法で、病原細菌の疫学的解析で多くの成果を挙げている (Maiden *et al.*, 1998; Urwin & Maiden, 2003). この方法は、データの互換性が高く、また、タンパク質コード遺伝子の塩基配列を得ることができるため、これらのデータを個体識別だけではなく、相同組換えの推定、塩基・アミノ酸置換数推定、あるいは集団間の相同組換え率・点突然変異率の推定にも利用することが可能な方法として、細菌の系統分類学だけでなく、微生物生態学分野でも広く利用されている。

ビブリオ科細菌 (*Vibrionaceae*) は、1965年に、グラム陰性通性嫌気性桿菌の中でオキシダーゼ試験陽性の一群に、Véron が与えた分類階級である (澤辺, 2008). *Vibrionaceae* を構成する *Vibrio* 属の属名は“vibrate (よく動く)”を語源とする。現時点で、*Vibrio* 属、*Salinivibrio* 属、*Grimontia* 属、*Enterovibrio* 属、*Aliivibrio* 属、*Photobacterium* 属の 6 属 93 種から構成されている巨大な細菌群である。環境で自由生活を行なっている種に加え、ヒト病原種、魚貝類病原種、人魚共通病原種に加え、海洋動物共生種も知られており、多様な環境で生息することができるほどの種分化を遂げた一群と捉えることができる (Thompson *et al.*, 2004; Reen *et al.*, 2006; 澤辺, 2008). また、一方で、近縁な種が多数存在し、分類学的な混乱を生じている種も多数含んでいる。そこで、本研究では、ヒトや海洋動物に重篤な感染症を引き起こす反面、物質循環や共生のキープレーヤーであり、今なお多くの新種が記載され続けているビブリオ科細菌を対象として、多遺伝子座配列解析 (MLSA) という集団遺伝学的方法論により、ビブリオ科細菌の再分類を行なうとともに、ビブリオの進化と種分化機構の解析を試みた。

実験方法

供試験菌株 *Vibrio* 属、*Photobacterium* 属、*Enterovibrio* 属、*Salinivibrio* 属及び *Grimontia* 属に分類されている 78 種の標準株を MLSA に供試した (Table 1). また *V. harveyi* グループの集団構造及び種

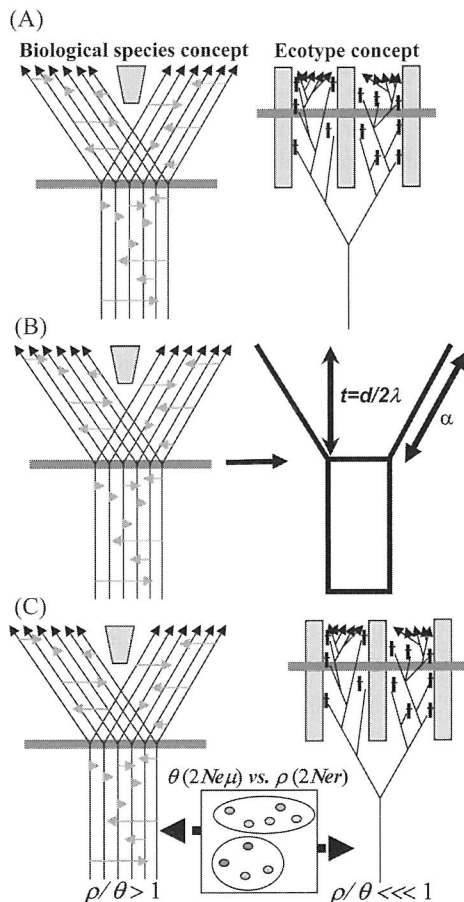


Fig. 1 Two major species concepts (A) (Doolittle & Papke, 2006), outline of split decomposition analysis (B) and evaluation of speciation process among bacterial populations by recombination (ρ) and point mutation (θ) ratio (C). t and α in (B) are radiation time and isolation index, respectively.

分化機構の解析には世界10カ国余りで分離された80株の *V. harveyi*, 24株の *V. campbellii* 及び2株の *V. rotiferianus* を供試した。各ビブリオ菌株はZoBell2216E 寒天あるいは液体培地を用い、各菌株の至適培養温度で培養した。

MLSA の対象遺伝子の設定と遺伝子配列解析
MLSA で対象とする遺伝子は、(i) 細菌の染色体上で300 kb 以上離れて分布し、(ii) 染色体上で単一コピーであり、(iii) 400 bp 以上の遺伝子領域を単一のコンセンサプライマーセットで増幅でき、(iv) 系統学的に有益な変異を持つ細胞構築に必須のタンパク質をコードする遺伝子であることが望ましい (Maiden *et al.*, 1998; Urwin & Maiden, 2003)。全ゲノム解析が報告されていた5種のビブリオ (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fischeri* 及び *P. profundum*) の遺伝子を *in silico* 解析し、*gapA* (グリセロールアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、解糖系)、*ftsZ* (細胞分裂タンパク質遺伝子、細胞分裂)、*mreB* (細胞骨格遺伝子、細胞骨格)、*topA* (I型トポイソメラーゼ遺伝子、DNA複製と修復) 及び *gyrB* (DNAジャイレースBサブユニット、DNA修復) を選抜した (Fig. 2, Table 2 及び3)。これに既報の *pyrH*, *recA*, *rpoA* (Thompson *et al.*, 2005) 及び16S rRNA 遺伝子 (*rrn*) の全ての遺伝子あるいは一部の遺伝子を加えて解析した。

細菌の染色体DNAはWizard Genomic DNA purification system (Promega, Madison, WI) で抽出精製し、この100 ngのDNAをPCR増幅の鋳型として供試した。各プライマーの塩基配列と会合温度はTable 2に示した。PCR増幅産物は1.5% アガロースゲル電気泳動に供試し、単一のバンドであることを確認した後、Wizard Gel & PCR purification system (Promega, Madison, WI) で精製した。DNA塩基配列は島津バイオテック塩基配列解析サービスを利用して決定した。

塩基配列の解析 得られた塩基配列はClustalXプログラム (Thompson *et al.*, 1994) を用いてアライメントを行なった。系統樹の作成には次の遺伝子領域を用いた: *ftsZ*; 133-625, *gapA*; 226-893, *gyrB*; 441-1030, *mreB*; 387-892, *pyrH*; 89-533, *recA*; 304-915, *rpoA*; 70-903, *rrn*; 155-1209 及び *topA*; 451-1076 (配列の番号は *V. cholerae* O1 Eltor N16961 (AE003852) に準ずる)。

スプリット分解解析 (Split decomposition analysis) は、比較する塩基配列の類似度マトリックスを基に描かれた系統樹に観察される不一致を解析するために考案された方法である (Dopazo *et al.*, 1993; Huson &

Bryant, 2005)。解析する遺伝子ごとに再構成される樹形が変わることが頻繁に観察されるが、この原因として遺伝子水平伝播や相同組換えによるものが含まれると考えられている。スプリット分解分析法ではこのような不一致性を網状図として再構成することで、解析する生物種間の共通祖先をより確からしい方法で可視化する (Fig. 1 (B))。本研究では9つの遺伝子が全て解析可能な58種のビブリオの塩基配列情報を用い、SplitsTree4 プログラムにより網状図の再構成を行なった。アライメントした各遺伝子の塩基配列を結合してプログラムに入力し、Jukes-Cantor 補正を行なった後、網状図 (neighbor net) として示した。またより多くの種の系統学的な位置及び得られたクレードの信頼度を知るために5-8遺伝子のみを用いた解析も試みた。

スプリット分解分析で網状根が得られたクレードに属する菌種については (Fig. 1 (B))、アミノ酸置換数を比較することで分岐年代の推定を行なった。アミノ酸置換数 (ボワソン補正) はMEGA version 3.0 プログラム (Kumar *et al.*, 2004) を用いて計算し、*E. coli* と *Salmonella enterica* の分岐年代を1億年 (Reid *et al.*, 2000; Hyma *et al.*, 2005) として標準化した。

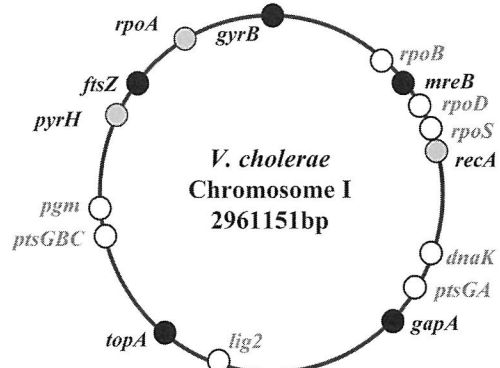
Vibrio harveyi グループの集団における相同組換え率及び点突然変異率の推定 *V. harveyi* は生物発光するユニークな細菌として発見された種である (Johnson & Shunk, 1936)。この生物発光は細胞密度感知型の遺伝子発現制御下にあることから、*V. harveyi* は細菌遺伝学の優れたモデルである (Waters & Bassler, 2005)。その一方で、現在までに約20カ国で約20種におよぶ海洋動物に感染症を引き起こし、海産の脊椎動物と無脊椎動物の両者を宿主とする重大な病原菌と認識されている (Austin & Zhang, 2006; Sawabe *et al.*, 2007b)。免疫不全や重度の火傷を患ったヒト患者にも感染することが報告されていることから (Pavia *et al.*, 1989; Wilkins *et al.*, 2008)、コレラ菌、腸炎ビブリオ及びバルニフィカス菌に次いで4番目に重要なビブリオとなっている。

世界各地で分離されている *V. harveyi* グループの集団構造と種分化機構を知るために、107株の *V. harveyi* グループの細菌について、7遺伝子のMLSA (*gapA*, *gyrB*, *ftsZ*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *topA*) を行なった。特に、集団間の相同組換え率 ($\rho = 2Ner$) と点突然変異率 ($\theta = 2Ne\mu$) の比、 ρ/θ 、が細菌の種分化機構の推定にも用いられるようになっている (Fig. 1 (C)) (Vergin *et al.*, 2007)。座位あたりの ρ と θ はLDhat version 2.1 プログラム (www.stats.ox.ac.uk/~mcvean/LDhat.html) を用いて計算した。

Table 1 Strains and sequence accession number for the Multi-locus sequence analysis.

Species	Strain	Accession number				
		<i>gapA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>mreB</i>	<i>topA</i>	<i>gyrB</i>
<i>Vibrio aerogenes</i>	LMG19650 ^T	DQ907270	DQ907330	DQ907401	EF114212	NT
<i>V. aestuarianus</i>	LMG7909 ^T	DQ907271	DQ907331	DQ907402	DQ907469	AB298200
<i>V. agarivorans</i>	LMG21448	DQ907272	DQ907332	DQ907403	DQ907470	AB298201
<i>V. alginolyticus</i>	LMG4409 ^T	DQ907274	EF027344	DQ907405	DQ907472	AB298202
<i>V. anguillarum</i>	LMG4437 ^T	DQ907275	DQ907334	DQ907406	DQ907471	AB298203
<i>V. brasiliensis</i>	LMG20546 ^T	DQ449619	DQ907335	DQ907407	DQ907473	AB298204
<i>V. calviensis</i>	LMG21294 ^T	DQ907276	DQ907336	NT	DQ907474	AB298263
<i>V. campbellii</i>	LMG11216 ^T	DQ449614	DQ907337	DQ907408	DQ907475	AB298205
<i>V. chagassii</i>	LMG21353 ^T	DQ481611	DQ996590	DQ481637	DQ481649	AB298206
<i>V. cholerae</i> O1 Eltor	IID6019	DQ907277	DQ907338	DQ907409	DQ907476	AB298207
<i>V. cholerae</i> O139	IID6024	DQ914238	DQ907339	DQ907410	DQ907477	NT
<i>V. cholerae</i>	LMG4406	DQ907273	DQ907333	DQ907404	DQ907478	NT
<i>V. cincinnatiensis</i>	LMG7891 ^T	DQ907278	DQ907340	DQ907411	DQ907479	AB298208
<i>V. corallilyticus</i>	LMG20984 ^T	DQ907279	DQ907341	DQ907412	EF114213	AB298210
<i>V. crassostrea</i>	LMG22240 ^T	DQ481612	DQ481624	DQ481638	DQ481650	AB298209
<i>V. cyclitrophicus</i>	LMG21359 ^T	DQ481613	DQ481625	DQ481639	DQ481651	AB298211
<i>V. diazotrophicus</i>	LMG7893 ^T	DQ907280	DQ907342	DQ907413	DQ907480	AB298212
<i>V. ezrae</i>	LMG19970 ^T	AY546645	DQ907343	DQ907414	DQ907481	AB298213
<i>V. fischeri</i>	LMG4414 ^T	AY546637	DQ907344	DQ907415	DQ907482	AB298214
<i>V. fluvialis</i>	LMG7894 ^T	DQ907281	DQ907345	DQ907416	DQ907483	AB298215
<i>V. fortis</i>	LMG21557 ^T	DQ907282	DQ907346	DQ907417	DQ907484	AB298216
<i>V. furnissii</i>	LMG7910 ^T	DQ907283	EF027345	DQ907418	DQ907485	AB298217
<i>V. gallicus</i>	LMG21330 ^T	AY546654	DQ907347	DQ907419	DQ907486	AB298218
<i>V. gazogenes</i>	ATCC29988 ^T	DQ907284	DQ907348	DQ907420	NT	AB298258
<i>V. gigantus</i>	LMG22741 ^T	DQ481617	DQ481629	DQ979358	DQ481655	AB298219
<i>V. halotiticol</i>	IAM14596 ^T	AY546638	DQ907349	DQ907421	DQ907487	AB298220
<i>V. harveyi</i>	LMG4044 ^T	DQ449616	DQ907350	DQ907422	DQ907488	AB298221
<i>V. harveyi</i>	LMG7890	DQ449615	DQ907351	DQ907423	DQ907490	NT
<i>V. harveyi</i>	LMG19643	DQ449622	DQ907380	DQ907452	DQ907518	AB298265
<i>V. hepatarius</i>	LMG20362 ^T	DQ907285	DQ907352	DQ907424	DQ907491	AB298222
<i>V. hispanicus</i>	LMG13240 ^T	DQ907286	DQ907353	DQ907425	DQ907492	AB298223
<i>V. ichthyoveneri</i>	LMG19664 ^T	DQ907287	DQ907354	DQ907426	DQ907493	AB298224
<i>V. kanaloae</i>	LMG20539 ^T	DQ481619	DQ481631	DQ481643	DQ481657	AB298225
<i>V. lentus</i>	R3884	DQ907288	DQ914234	DQ914236	DQ914237	AB298226
<i>V. logei</i>	LMG14011	DQ907289	DQ907355	DQ907427	DQ907494	AB298227
<i>V. mediterranei</i>	LMG11258 ^T	DQ907290	DQ907356	DQ907428	DQ907495	AB298228
<i>V. mediterranei</i>	LMG19703	DQ907310	DQ907377	DQ907449	DQ907496	NT
<i>V. metschnikovii</i>	LMG11664 ^T	DQ907291	EF027346	DQ907429	DQ907497	AB298229
<i>V. mimicus</i>	LMG7896 ^T	DQ907292	DQ907357	DQ907430	DQ907498	AB298230
<i>V. mytili</i>	LMG19157 ^T	DQ907293	DQ907358	DQ907431	DQ907499	AB298231
<i>V. natriegens</i>	LMG10935 ^T	DQ907294	DQ907359	DQ907432	DQ907500	AB298232
<i>V. navarrensis</i>	LMG15976 ^T	DQ907295	DQ907360	DQ907433	DQ907501	AB298233
<i>V. neptunus</i>	LMG20536 ^T	DQ907296	DQ907361	DQ907435	DQ907503	AB298234
<i>V. nereis</i>	LMG3895 ^T	DQ449617	DQ907362	DQ907436	DQ907504	AB298235
<i>V. neonatus</i>	LMG19973 ^T	AY546644	DQ907363	DQ907434	DQ907502	AB298257
<i>V. nigrilipulchritudo</i>	LMG3896 ^T	DQ907297	EF027347	DQ907437	DQ907505	AB298236
<i>V. ordalii</i>	LMG13544 ^T	DQ907298	DQ907364	DQ907438	DQ907506	AB298237
<i>V. orientalis</i>	LMG7897 ^T	DQ907299	DQ907365	DQ907439	DQ907507	AB298238
<i>V. pacinii</i>	LMG19999 ^T	DQ907300	DQ907366	NT	DQ907508	AB298264
<i>V. parahaemolyticus</i>	LMG2850 ^T	DQ449618	DQ907367	DQ907440	DQ907509	AB298239
<i>V. pectenicida</i>	LMG19642 ^T	DQ907301	DQ907368	DQ907441	DQ907510	AB298240
<i>V. pelagius</i>	ATCC25916 ^T	DQ907302	DQ907369	DQ907442	DQ907511	AB298241
<i>V. penaeicida</i>	LMG19663 ^T	DQ907303	DQ907370	NT	DQ907512	AB298260
<i>V. pomeroyi</i>	LMG20537 ^T	DQ481621	DQ481634	DQ481646	DQ481660	AB298242
<i>V. ponticus</i>	DSM16217 ^T	DQ907304	DQ907371	DQ907443	DQ907513	AB298243
<i>V. proteolyticus</i>	LMG3772 ^T	DQ907305	EF114210	DQ907444	DQ907514	AB298261
<i>V. rotiferianus</i>	LMG21460 ^T	DQ449619	DQ907372	DQ907445	DQ907515	AB298244
<i>V. ruber</i>	LMG23124 ^T	DQ907306	DQ907373	EF114211	EF114212	AB298267
<i>V. rumoiensis</i>	S-1-6 ^T	DQ907307	DQ907374	DQ907446	DQ907516	AB298245
<i>V. salmonicida</i>	LMG14010 ^T	DQ907308	DQ907375	DQ907447	DQ907517	AB298246
<i>V. scophthalmi</i>	LMG19158 ^T	DQ907309	DQ907376	DQ907448	DQ907518	AB298247
<i>V. splendidus</i>	LMG19031 ^T	DQ481622	DQ481635	DQ481647	DQ481662	AB298248
<i>V. superstes</i>	LMG21323 ^T	AY546650	DQ907378	DQ907450	DQ907519	AB298256
<i>V. tapetis</i>	LMG19706 ^T	DQ907311	DQ907379	DQ907451	DQ907520	AB298249
<i>V. tasmaniensis</i>	LMG20012 ^T	DQ481623	DQ481636	DQ481648	DQ481661	AB298250
<i>V. tubiashii</i>	LMG10936 ^T	DQ907312	DQ907381	DQ907453	DQ907521	AB298251
<i>V. vulnificus</i>	LMG13545 ^T	DQ907313	DQ907382	DQ907454	DQ907522	AB298252
<i>V. wodanis</i>	NCIMB13582 ^T	DQ907314	DQ907383	DQ907455	DQ907523	AB298253
<i>V. xuii</i>	LMG21346 ^T	DQ907315	DQ907384	DQ907456	DQ907524	AB298254
<i>P. angustum</i>	LMG8455 ^T	DQ907257	DQ907318	DQ907385	DQ907457	AB298187
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	LMG7892 ^T	DQ907258	DQ907319	DQ907386	DQ907458	AB298188
<i>P. frigidipholum</i>	JCM12947 ^T	DQ907259	DQ907320	DQ907387	DQ907459	AB298189
<i>P. damsela</i>	JCM8968	DQ907260	DQ907321	DQ907388	DQ907460	AB298190
<i>P. iliopiscarius</i>	DSM9896 ^T	DQ907261	DQ907322	DQ907389	DQ907461	AB298191
<i>P. indicum</i>	NBRC14233 ^T	DQ907262	DQ907323	DQ907390	DQ907462	AB298192
<i>P. leiognathi</i>	LMG4228 ^T	DQ907263	DQ907324	DQ907391	DQ907463	AB298193
<i>P. lipolyticus</i>	DSM16190 ^T	DQ907264	DQ907325	DQ907392	DQ907464	AB298194
<i>P. phosphoreum</i>	IAM14401 ^T	DQ907265	DQ907326	DQ907393	DQ907465	AB298195
<i>P. rosenbergii</i>	LGM 22223 ^T	DQ907267	DQ907328	DQ907395	DQ907467	AB298197
<i>Grimontia hollisae</i>	LMG17719 ^T	DQ907317	EF027348	DQ907398	EF114215	AB298259
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	LMG19839 ^T	DQ907269	EF027349	DQ907397	EF114216	AB298198
<i>E. coralli</i>	LMG22228 ^T	DQ907268	DQ907329	DQ907396	EF114217	AB298199
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	LMG11651 ^T	DQ907316	EF027351	DQ907399	DQ907468	AB298255

NT: Not tested.

**Fig. 2** Relative location of MLSA gene candidates on *Vibrio cholerae* O1 Eltor N16961 (AE003852) genome. Genes marked by closed symbol were determined in this study. Genes indicated by gray circle were sequenced by Thompson *et al.* (2005). Genes with open circle were only used for *in silico* analysis (see Table 2).**Table 2** In silico analysis of candidate genes for the vibrio-MLSA.

Gene	Resolution (%) ^a		Consensus region
	High	Low	
16S (<i>rrn</i>)	97.39 (VP-VV)	91.97 (VC-PP)	Yes
23S	95.91 (VP-VV)	92.39 (VC-PP)	Yes
<i>gapA</i>	94.28 (VP-VV)	82.18 (VC-PP)	Yes
<i>ptsGA</i>	88.43 (VP-PP)	82.16 (VF-VC)	Yes?
<i>atpA</i>	90.59 (VP-VV)	80.74 (PP-VC)	Yes
<i>rpoB</i>	90.44 (VP-VV)	-	Yes
<i>mreB</i>	85.25 (VP-VV)	80.36 (VC-VF)	Yes
<i>rpoA</i>	95.17 (VP-VV)	83.74 (VP-PP)	Yes
<i>dnaK</i>	87.65 (VP-VV)	79.74 (VC-VF2)	No
<i>pyrH</i>	84.99 (VV-VP)	77.73 (VF-PP)	Yes
<i>recA</i>	82.70 (VC-VV)	73.64 (VV-PP)	Yes
<i>gyrA</i>	82.65 (VP-VV)	-	Yes?
<i>ptsGBC</i>	88.12 (VV-VP)	73.04 (PP-VC)	Yes?
<i>rpoD</i> (sigma 70)	85.40 (VP-VV)	-	Yes
Formate dehydrogenase Fe-S	83.58 (VV-VC)	76.03 (PP-VC)	Yes?
<i>gyrB</i>	82.26 (VP-VV)	74.40 (VC-PP)	Yes
<i>ftsZ</i>	83.25 (VP-VV)	72.35 (VC-VF)	Yes
<i>pgm</i>	76.12 (VC-VV)	71.04 (VC-PP)	No (group)
<i>topA</i>	79.16 (VP-VV)	70.71 (VC-PP)	Yes
<i>obg</i>	81.37 (VP-VV)	67.5 (VC-PP)	Yes?
<i>rpoS</i> (sigma 38)	77.30 (VP-VC)	68.64 (VC-PP)	No
Formate dehydrogenase cb556	75.12 (VV-VP)	64.07 (VV-PP)	No
NAD dependent DNA ligase	69.41 (VP-VF)	65.80 (VV-PP)	No (group?)
ATP dependent DNA ligase	62.28 (VP-VV)	-	No (group?)
<i>toxR</i>	61.59 (VP-VV)	51.84 (VV-VF)	No (group?)
<i>toxS</i>	65.60 (VP-VV)	52.49 (VV-VF)	No (group?)

^a: VC: *V. cholerae*, VP: *V. parahaemolyticus*, VF: *V. fischeri*, VV: *V. vulnificus*, PP: *P. profundum*.

Table 3 Amplification and sequence primers for the vibrio-MLSA.

Target gene	Primer	Sequence	Amplicon (bp)	Annealing temp. (C)	Target
<i>gapA</i> (glyceraldehydes-3-phosphodehydrogenase gene, glycolysis)	VgapA150F VgapA899R	AACTCACGGTTCGTTTCAAC CGTTGTCGTACCAAGATAC	750	50	Most of species
<i>ftsZ</i> (cell division protein gene, cell division)	VftsZ75F VftsZ800R	GCTGTTGAACACATGGTACG GCACCAGCAAGATCGATATC	750	50	Most of species
<i>topA</i> (topoisomerase I, DNA replication and repair)	VftsZ75F	GCTGTTGAACACATGGTACG	600	50	<i>Salinivibrio</i> , <i>Enterovibrio</i> , <i>Grimontia</i> and <i>V. alginolyticus</i>
	VftsZ700R	ATCATGGCGTGACCCATTTC			
	VtopA3F	GGGTAATCTCTCGTTATCG	1200	43	<i>Salinivibrio</i> , <i>Enterovibrio</i> , and <i>Grimontia</i>
	VtopA1200R	GAAGGACGAATCGCTTCGTG			
	VtopA400F	GAGATCATCGGTGGTGATG	800	50	Most of species
	VtopA1200R	GAAGGACGAATCGCTTCGTG			
<i>mreB</i> (rod shaping protein gene B subunit, cell cytoskeleton)	VtopA350F	AGCTATTGCATGGCACCTTC	850	45	<i>Enterovibrio</i> and <i>V. colalliyticus</i>
	VtopA1200R	GAAGGACGAATCGCTTCGTG			
	VmreB12F	ACTTCGTGGCATGTTTTTC	1000	50	Most of species
	VmreB999R	CCGTGCATATCGATCATTTC			
	VmreB360F	GTGGTTCTACCAAGTTGAG	600	43	<i>V. haliotocoli</i> -relatives and <i>V. pacinii</i>
	VmreB999R	CCGTGCATATCGATCATTTC			
<i>gyrB</i> (DNA gyrase B subunit, basic replication machinery)	VgyrB274F	GAAGTTATCATGACGGTACTTC	900	55	Most of species
	VgyrB1171R	CCTTTACGACGAGTCATTTC			
	VgyrB325F	TACAAAGTATCGGGTGGTCT	1200	55	<i>P. damsela</i> , <i>V. gallicus</i> , and <i>V. haliotocoli</i>
	VgyrB1486R	ACGCTCTGCGTCGGTCATGAT			
	VgyrB280F	ATCATACGCGTACTGCACGC	900	55	<i>V. ordalii</i> and <i>S. costicola</i>
	VgyrB1171R	CCTTTACGACGAGTCATTTC			
<i>pyrH</i> (Uridylate kinase, nucleotide biosynthesis)	VpyrH80F	GATCGTATGGCTCAAGAAG	450	50	Most of species
	VpyrH530R	TAGGCATTTTGTGGTCACG		50	
<i>recA</i> (recA protein, DNA repair)	VrecA130F	GTCTACCAATGGGTCTGATC	600	50	Most of species
	VrecA720R	GCCATTGTAGCTGTACCAAG		50	

結果と考察

ビブリオ MLSA スキームの構築と各遺伝子の種間解像度 78種のビブリオについて、機能が異なる5つのタンパク質コード遺伝子を増幅し、配列を決定するスキームを構築することができた。これに既報の3遺伝子を加えて、各遺伝子の種間解像度 (Scola *et al.*, 2003) を比較したところ、*topA* 遺伝子が87.5%と最も高い種間解像度を示し、*rpoA* 遺伝子が97.9%と最も低かった (Fig. 3)。*topA* に次いで、*gyrB*, *mreB*, *pyrH* そして *recA* の順に解像度は高かった。後で示す *gyrB* 遺伝子のように、この種間解像度が高くても、ある特定のビブリオ種内では種を判別する解像度が低い場合もあるが (Fig. 5 (B)), 多くのタンパク質コード遺伝子において、種間解像度が極めて低い *rrn* (99.5% 種間解像度, 95.3%–100% の範囲) よりも種同定精度が高いと考えられた (Fig. 3)。

MLSA に基づくビブリオ科細菌の再分類 利用可能な9つの遺伝子 (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rrn*, *rpoA* 及び *topA*) を用い、スプリット分解解析法でビブリオの分子進化と系統を再構成した結果、明確な網状根が観察された少なくとも14のクレードが見いだされた (Fig. 4)。また、5-8遺伝子を用いた MLSA により、さらにいくつかのクレードが見いだされた (Sawabe *et al.*, 2007a) 各クレードに属する種間での相

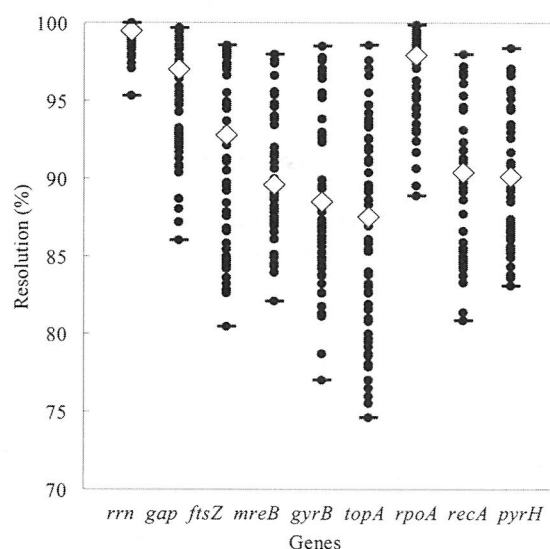


Fig. 3 Interspecific discriminatory power (DP) of MLSA genes for *Vibrionaceae* species. Open diamond is a Median of each gene defined as DP.

同組換えは統計学的に有意であり、かつ5-8遺伝子を用いたスプリット分解解析でも高いブートストラップ確率で維持されていたことから、これらのクレードに属する菌種は祖先を共通とする単系統群である可能性は高いと考えられた。

ほとんどのクレードにおいて、クレードに属する種

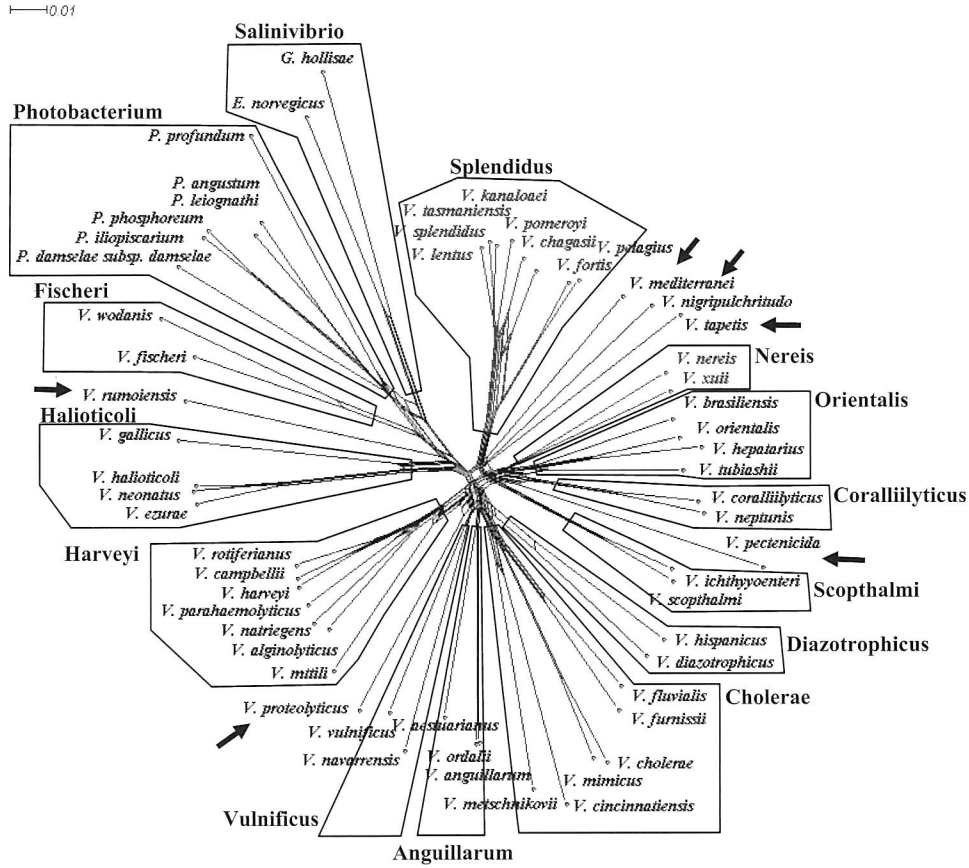


Fig. 4 Proposed clades based on 9-gene-MLSA for *Vibrionaceae*. *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *topA* and 16S rRNA gene sequences (6050bp) from 58 taxa were concatenated, and analyzed by SplitsTree4 program. Orphan species are marked by arrow. Sequences similarity was corrected by Jukes-Cantor correction. All nodes were supported by 100 bootstrap replications.

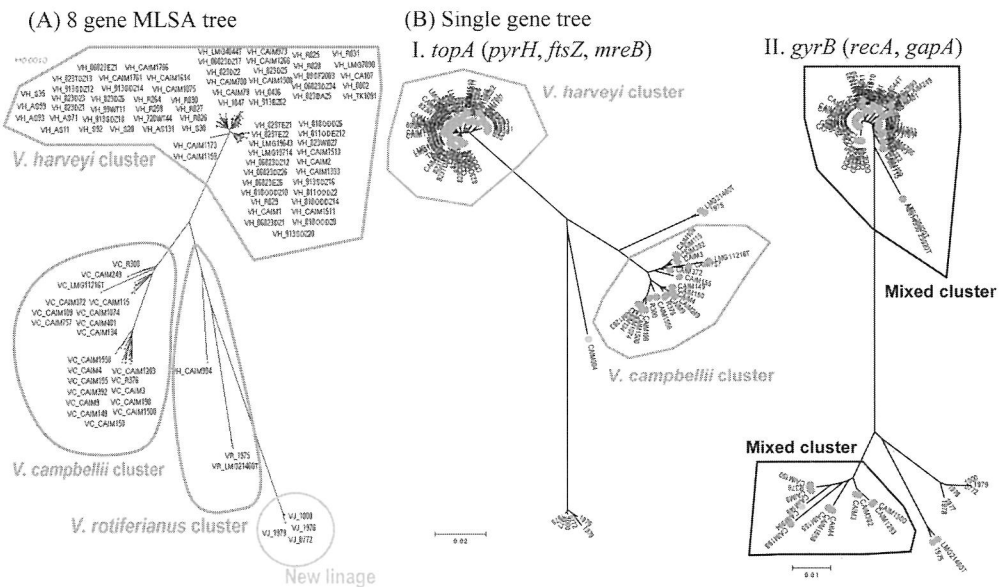


Fig. 5 MLSA for *Vibrio harveyi* group species. (A) 8-gene-MLSA tree, and (B) representative single gene trees which are showing different topology.

Table 4 Representative clades/subclades proposed by means of the vibrio-MLSA.

Clade (Subclade)	Described species included	DDH value (%)	GC moles %	MLSA concatenated similarity (%)	AAI (%)	Phi test	Estimated radiation time (x10 ⁸ year) *	Habitat
Anguillarum	<i>V. anguillarum</i> <i>V. aestuarianus</i> <i>V. ordalii</i>	>30	43-46	88.9-98.6	95.7-99.6	-	0.56 (Vang-Vord) 3.76 (Vang-Vaes)	Brackish, seawater & fish
Cholerae	<i>V. cholerae</i> <i>V. cincinnatiensis</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. metschnikovii</i> <i>V. mimicus</i>	NA	44-50	85.4-94.7	92.8-99.6	<i>P</i> < 0.1	0.30 (Vcho-Vmim) 1.79 (Vflu-Vfur) 3.59 (Vcin-Vmet)	Brackish, seawater & plankton
Fischeri	<i>Al. fischeri</i> <i>Al. logei</i> <i>Al. salmonicida</i> <i>Al. wodanis</i>	>36	39-42	89.8-94.4	95.2	<i>P</i> < 0.1	3.90 (Vfis-Vlog)	Seawater, squid & fish
Haliotocoli	<i>V. haliotocoli</i> <i>V. ezurae</i> <i>V. gallicus</i> <i>V. neonatus</i> <i>V. superstes</i>	>22	39-42	88.0-97.7	94.7-99.5	<i>P</i> < 0.1	0.23 (Vhal-Vneo) 1.11 (Vhal-Vezu) 3.65 (Vhal-Vgal)	Gut of abalone
Harveyi	<i>V. harveyi</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. campbellii</i> <i>V. mytili</i> <i>V. natriegens</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. rotiferianus</i>	>25	42-48	90.1-96.2	97.2-99.4	<i>P</i> < 0.1	0.39 (Vhar-Vcam) 1.05 (Vhar-Vpar) 1.81 (Vhar-Vmyt) 2.06 (Valg-Vpar)	Seawater, salt marsh mud & marine animal
Orientalis	<i>V. orientalis</i> <i>V. brasiliensis</i> <i>V. hepatarius</i> <i>V. tubiashii</i>	>24	43-46	91.2-94.2	97-97.9	<i>P</i> < 0.1	3.64 (Vori-Vtub)	Brackish & seawater
Splendidus	<i>V. splendidus</i> <i>V. chagasii</i> <i>V. crassostrea</i> <i>V. cyclitrophicus</i> <i>V. fortis</i> <i>V. gigantis</i> <i>V. kanaloae</i> <i>V. lentus</i> <i>V. pelagius</i> <i>V. pomeroyi</i> <i>V. tasmaniensis</i>	>30	39-47	90.6-96.5	96.5-99.8	<i>P</i> < 0.1	0.17 (Vspl-Vtas) 1.61 (Vspl-Vcha) 2.59 (Vspl-Vpel)	Seawater & marine animal
Vulnificus	<i>V. vulnificus</i> <i>V. navarrensis</i>	>30	45-48	88.6	96.4	-	2.65	Sewage, seawater, eel & oyster
Photobacterium (Damselae)	<i>P. damsela</i>	-	42	-	-	-	-	Seawater & fish
(Leioognathi)	<i>P. leioognathi</i> <i>P. angustum</i>	>44	40-44	94.0	98.6	-	1.07	Seawater & light organ
(Rosengergii)	<i>P. rosenbergii</i>	-	48	-	-	-	-	Seawater & coral

* The radiation time was calculated with average amino acid substitution numbers.

NA: Data not available.

間の DNA-DNA 類似度 (DDH) は 20% 以上, GC 含量 (GC moles%) の差は 5% 以内, MLSA の塩基配列類似度は 85% 以上, 平均アミノ酸同一性 (AAI: Konstantinidis & Tiedje, 2005) は 89% 以上であった (Table 4). *Vibrio* 属には, 1) Anguillarum クレード (*V. anguillarum*, *V. aestuarianus* 及び *V. ordalii*) ; 2) Cholerae クレード (*V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* 及び *V. mimicus*) ;

3) Coralliilyticus クレード (*V. neptunis* 及び *V. coralliilyticus*) ; 4) Fischeri クレード (*V. fischeri*, *V. logei*, *V. salmonicida* 及び *V. wodanis*) ; 5) Diazotrophicus クレード (*V. diazotrophicus* 及び *V. hispanicus*) ; 6) Gazogenes クレード (*V. aerogenes*, *V. gazogenes* 及び *V. ruber*) ; 7) Haliotocoli クレード (*V. haliotocoli*, *V. ezurae*, *V. gallicus*, *V. neonatus* 及び *V. superstes*) ; 8) Harveyi クレード (*V. harveyi*, *V.*

alginolyticus, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* 及び *V. mytilii*); 9) Nereis クレード (*V. nereis* 及び *V. xuii*); 10); Nigripulchritudo クレード (*V. nigripulchritudo* 及び *V. penaeicida*); 11) Orientalis クレード (*V. orientalis*, *V. brasiliensis*, *V. hepatarius* 及び *V. tubiashii*); 12) Scophthalmi クレード (*V. ichthyenteri* 及び *V. scophthalmi*); 13) Splendidus クレード (*V. splendidus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. lentus*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis*, *V. crassostrea*, *V. tasmaniensis*, *V. pelagia* 及び *V. fortis*) 及び 14) Vulnificus クレード (*V. vulnificus* 及び *V. navarrensis*) が認められた。また, *V. agarivorans*, *V. mediterranei*, *V. pacinii*, *V. pectenica*, *V. ponticus*, *V. proteolyticus*, *V. rumoiensis* 及び *V. tapetis* は単一種からなるクレードであった。今後, これらの近縁種が発見されることにより, より明確なビブリオの進化の系譜が明らかになると考えられる (Fig. 4)。

全ての *Photobacterium* 属菌種は単一のクレードに属したが, 明確な網状根を持つ5つのサブクレードが観察された。また, *S. costicola*, *E. norvegicus*, *E. corallii*, *G. hollisae* 及び *V. calviensis* は *Vibrio* 属 及び *Photobacterium* 属とは異なるクレードに属することが示唆された (Fig. 4)。

SplitsTree4 プログラムに含まれる Phi テストを用いてビブリオ科細菌間の相同組換えの確率を検討したところ, 網状根が観察されたクレード (Cholerae, Fischeri, Halioticoli, Harveyi, Orientalis 及び Splendidus) に属する種間の相同組換えは統計学的に有意 ($P < 0.05$) であった (Table 4)。本研究では相同組換えの検出はあくまで統計学的推定に基づいているため擬陽性の結果が含まれていることは否定できないため, 実験的に相同組換えを検出する方法論を見いだして検証しなければならない。

各クレードの分岐年代の推定 8つのタンパク質コード遺伝子の平均アミノ酸置換数を *E. coli* と *Sal. enterica* の分岐年代 (1 億年) で標準化し, 各ビブリオクレードの分岐年代推定を試みた (Table 4)。DNA-DNA 類似度が 60% 近い値を示すきわめて近縁な種間, 例えば *V. cholerae* と *V. mimicus*, *V. anguillarum* と *V. ordalii*, *V. harveyi* と *V. campbellii*, 及び *V. halioticoli* と *V. neonatus* の分岐年代は 2,300~5,600 万年前と推定された (Table 4)。魚貝類の消化管や発光器の常在菌種を多く含む *Anguillarum*, *Fischeri* 及び *Halioticoli* クレードの分岐年代は 3~4 億年前と推定された。この年代はデボン紀に相当し, この年代の地層には魚類の多様

な化石が見つかることから魚類の爆発的な種分化が生じたと考えられている。これらのビブリオのクレードは宿主の魚介類の種分化に伴い細菌も種分化したのかもしれない。*Salinivibrio*, *Enterovibrio* 及び *Grimontia* の分岐はカンブリア紀爆発と呼ばれる生物種の多様化が進んだと考えられている 5.8~6.2 億年前に生じたと推定された。

各クレードの遺伝学的及び生態学的類似性 提案したクレードに属する菌種は比較的類似した遺伝形質を持つものが含まれた。例えば *Anguillarum* クレードに含まれた種は GC 含量が 43~46% の範囲であった。また *V. anguillarum* と *V. ordalii* の DNA-DNA 類似度は 58% であり, *V. anguillarum* と *V. aestuarianus* のそれも 30% 程度である (Farmer *et al.*, 2005)。

Cholerae クレードには GC 含量が 44~50% の範囲にある 6 菌種が含まれた。このクレードはビブリオ科で高い GC 含量を示すクレードである (Farmer *et al.*, 2005)。このクレードに含まれる種は汽水及び淡水を主たる生息場所とし, ほとんどのものがヒトに下痢を引き起こす。*V. fluvialis* 及び *V. metchnikovii* はコレラ様下痢を引き起こすことが知られている。*V. cholerae* と *V. mimicus* 及び *V. fluvialis* と *V. furnisii* の高い DNA-DNA 類似度は MLSA でも支持された。このクレードに属する種は低い Na⁺ イオン要求性示す。例えば *V. cholerae* と *V. metchnikovii* のそれは 5-15 mM, *V. fluvialis* のそれは 20-40 mM である (Farmer *et al.*, 2005)。

Vibrio harveyi の集団構造と種分化機構の推定 Harveyi クレードには海洋動物病原ビブリオとして近年注目されている *V. harveyi* 及びその近縁種である *V. campbellii* 及び *V. rotiferianus* が含まれる。7 遺伝子 MLSA により *V. harveyi*, *V. campbellii* 及び *V. rotiferianus* に属する 100 株を超える菌株を解析したところ, これら 3 菌種は明確に区別される異なるクラスターを形成した (Fig. 5 (A))。7 遺伝子の中では, 単独の遺伝子で MLSA 系統樹と類似した樹形を形成する遺伝子は *ftsZ*, *mreB*, *pyrH* 及び *topA* であった (Fig. 5 (B))。これに対し, *gapA*, *gyrB* 及び *recA* は, *V. harveyi* と *V. campbellii* 菌株が混在したクラスターを形成し, *V. harveyi* の同定精度は低いことが示唆された。

また, *V. harveyi* 及び *V. campbellii* における ρ/θ はそれぞれ 12.3 及び 1.3 であり, *V. harveyi* では集団内での「相同組換え」が「点突然変異」よりも強いことが示唆された。

以上、ビブリオのMLSAに基づく集団遺伝学的な解析により、ビブリオの進化に関する新しい考え方を提案することができた。ビブリオ科細菌は海洋環境下で多彩な種分化を示す菌群であることから、地球史と重ね合わせることでダイナミックな細菌の種分化を理解するための優れた研究モデルになると考えられる。今後、クレードごとに、クレードに属する菌種をまるごと比較ゲノム解析することで、精度の高い解析に結びつくと考えている。

要 約

ビブリオ科細菌は、ヒトや海洋動物に重篤な感染症を引き起こす反面、物質循環や共生のキープレーヤーであり、今なお多くの新種が記載され続けている。本菌群を対象として、多遺伝子座配列解析 (MLSA) という集団遺伝学的方法論により、時間軸を置いた系統分類を試みた。ビブリオのMLSA解析に適する5種の遺伝子 (*gapA* (中央代謝), *ftsZ* (細胞分裂装置), *mreB* (アクチン様細胞骨格), *topA*, *gyrB* (ともにDNA修復)) を見だし、その配列を決定するとともに、これらの遺伝子に既報の *rrn*, *recA*, *rpoA*, 及び *pyrH* 遺伝子を加えた解析を行なったところ、ビブリオ科には少なくとも14のクレードが見いだされた。各クレードに属する種は遺伝学的や生態学的な性質は類似していた。 *Salinivibrio*, *Enterovibrio* 及び *Grimontia* はカンブリア爆発が生じたとされる約6億年前に分岐したと推定された。また、 *Vibrio anguillarum*, *V. cholerae*, *V. fischeri* 及び *V. haliotocoli* が属するクレードは、魚類の爆発的な種分化が生じたとされる約3億5千万年前にそれぞれ分岐したと推定された。

本助成で得られた研究成果の報告

本研究助成の研究成果は、19の口頭発表 (うち7つは国際会議) 及び9の論文として公表した。以下に公表した論文を示す。

- 1) Kita-Tsukamoto, K., Yao, K., Kamiya, A., Yoshizawa, S., Uchiyama, N., Wada, M. & Kogure, K. (2006). Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS Microbial. Let.* **256**: 298-303.
- 2) Wada, M., Kamiya, A., Uchiyama, N., Yoshizawa, S., Kita-Tsukamoto, K., Ikejima, K., Yu, R., Imada, C., Karatani, H., Mizuno, N., Suzuki, Y., Nishida, M. & Kogure, K. (2006). *luxA* gene of light organ symbionts of the bioluminescent fish *Acropoma japonicum* (*Acropomatidae*) and *Siphamia versicolor* (*Apogonidae*) forms a lineage closely related to that of *Photobacterium leiognathi* subsp. *mandapamensis*. *FEMS Microbial. Let.*

260: 186-192.

- 3) Fukui, Y. & Sawabe, T. (2007). Improved one-step colony PCR detection of *Vibrio harveyi*. *Microbes Environ.* **22**: 1-10.
- 4) Sawabe, T., Fujimura, Y., Niwa, K. & Aono, H. (2007). *Vibrio comitans* sp. nov., *Vibrio rarus* sp. nov. and *Vibrio inusitatus* sp. nov. from the gut of abalone *Haliotis discus discus*, *H. gigantea*, *H. madaka* and *H. rufescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 916-922.
- 5) Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T. R. & Sawabe, T. (2007). Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* form distinct species. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4279-4285.
- 6) Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y. & Miura, H. (2007). Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ.* **22**: 300-308.
- 7) Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. & Thompson, F. L. (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* **189**: 7932-7936. なお、本論文は、“Mapping vibrio evolutionary history”として、Journal Highlights (ASMの2007年11月月間ベスト論文) に掲載された。 *Microbes* 2: 608.
- 8) Fukui, Y. & Sawabe, T. (2008). Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR. *Microbes Environ.* **23**: 172-176.
- 9) Rameshkumar, N., Fukui, Y., Sawabe, T. & Nair, S. (2008). *Vibrio porteresiae* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a mangrove associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1608-1615.

保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した菌株のうち新種の記載や成果報告の対象となった51株を German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (LMG) 及び NITE Biological Resource Center (NBRC) などの菌株保存機関に寄託した。以下に代表的な菌株を示した。

Vibrio haliotocoli HE1-1 = LMG 23443=DSM 17532

Vibrio neonatus GHD2-1 = LMG 23414

Vibrio ezurae NHG1-29 = LMG 23423

Vibrio comitans GHG2-1^T = LMG 23416^T=NBRC 102076^T

Vibrio inusitatus RW14^T = LMG 23434^T=NBRC 102082^T

Vibrio rarus RW22^T = LMG 23674^T=NBRC 102084^T

Vibrio alginolyticus subsp. *swingnii* 99WF10-27 = LMG 23675

謝 辞

本研究に対し3年間にもわたり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。

す。また、先に列記した木暮一啓教授をはじめ国内、国外の共同研究者の皆様及び本研究の実験の一部を行ってくれた小泉真一君、鶴谷安弘君に御礼申し上げます。

文 献

- Austin, B. & Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Let. Appl. Microbiol.* **43**: 119-124.
- Buckley, M. & Roberts, R.J. (2006). Reconciling microbial systematics and genomics. ASM report (Available on line; <http://www.asm.org/Academy/index.asp?bid=54420>).
- Doolittle, W.F. & Papke, R.T. (2006). Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biol.* **7**: 116.1-116.7.
- Dopazo, J., Dress, A. & von Haeseler, A. (1993). Split decomposition: A technique to analyze viral evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10320-10324.
- Farmer III, J.J., Janda, J.M., Brenner, F.W., Cameron, D.N. & Birkhed, K.M. (2005). *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}, *In* Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., & Garrity, G.M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. vol. 2, part B, p. 494-546, Springer-Verlag, New York.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., de Peer, Y.V., Vandamme, P., Thompson, F.L. & Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. (2005). Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* **3**: 6.1-6.7.
- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. (2006). Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**: 1917-1927.
- Huson, D.H. & Bryant, D. (2005). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 254-267.
- Hyma, K.E., Lacher, D.W., Nelson, A.M., Bumbaugh, A.C., Janda, J.M., Strocjine, N.A., Young, V. B. & Whittam, T.S. (2005). Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.* **187**: 619-628.
- Johnson, F.H. & Shunk, I.V. (1936). An interesting new species of luminous bacteria. *J. Bacteriol.* **31**: 585-593.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J. Bacteriol.* **187**: 6258-6264.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, A., Feil, E. & et al. (1998). Multilocus sequence typing : A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3140-3145.
- Nesbo, C.L., Dlutek, M. & Doolittle, W.F. (2006). Recombination in *Thermotoga*: Implications for species concepts and biogeography. *Genetics* **172**: 759-769.
- Papke, R.T., Koenig, J. E., Rodriguez-Valera, F. & Doolittle, W.F. (2007). Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*. *Science* **306**: 1928-1929.
- Pavia, A.T., Bryan, J.A., Maher, K.L., Hester, Jr., T.R. & Farmer, III, J.J. (1989). *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annal. Intern. Med.* **111**: 85-86.
- Reen, F.J., Almagro-Moreno, S., Ussery, D. & Boyd, E.F. (2006). The genomic code: Inferring *Vibrionaceae* niche specialization. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 697-704.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. & Whitam, T.S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. & Thompson, F.L. (2007a). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* **189**: 7932-7936.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y. & Miura, H. (2007b). Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ.* **22**: 300-308.
- 澤辺智雄. (2008). 自然界におけるビブリオーその多様性, 進化, 生態. *化学療法の領域* **24**: 24-32.
- Scola, B.L., Zeaiter, Z., Khamis, A. & Raoult, D. (2003). Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol.* **11**: 318-321.
- Spratt, B.G., Staley, J.T. & Fisher, M.C. (2006). Introduction: Species and speciation in micro-organisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**: 1897-1898.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Thompson, F.L., Iida, T. & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 403-431.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. & Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5107-5115.
- Urwin, R., & Maiden, M.C.J. (2003). Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**: 479-487.
- Vergin, K.L., Tripp, H.J., Wilhelm, L.J., Denver, D.R., Rappe M.S. & Giovannoni, S.J. (2007). High intraspecific recombination rate in a native population of *Candidatus Pelagibacter ubique* (SAR11). *Environ. Microbiol.* **9**: 2430-2440.
- Waters, C.M. & Bassler, B.L. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 319-346.
- Wilkins, S., Millar, M., Hemsworth, S., Johnson, G., Warwick, S. & Pizer, B. (2008). *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatr. Blood Cancer* **50**: 891-892.

日本産ヒアロスキファ科菌類（盤菌綱・ビョウタケ目）の 系統分類学的研究

細 矢 剛

国立科学博物館 植物研究部
〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1

Taxonomic studies of the Hyaloscyphaceae (Helotiales, Discomycetes) in Japan

Tsuyoshi Hosoya

Department of Botany, National Museum of Nature and Science
4-1-1 Amakubo, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-0005, Japan

Molecular phylogenetic studies based on sequence data from five gene regions (ITS-5.8S rRNA, RPB2, β -tubulin, D1/D2 LSU rRNA), and the combined data set of D1/D2 and RPB2 sequences were carried out on 37 species among seven genera in the family Hyaloscyphaceae, Helotiales. In a phylogeny inferred from the combined data of D1/D2 and RPB2 sequences, seven strongly supported clades were detected. The clades were also recognized in trees based on each gene, though some clades were not strongly supported. Four clades were represented by *Albotricha*, *Brunnipila*, *Incrucipulum*, and *Lachnellula*, respectively, while members of *Lachnum* were placed in the remaining three clades. Because our molecular phylogeny strongly supported a group with granulate hairs, the hair as a taxonomic character was found to have phylogenetic importance.

Key words: Hyaloscyphaceae, *Lachnum*, molecular phylogeny, taxonomy

緒 言

ヒアロスキファ科 Hyaloscyphaceae の菌類は子囊盤に様々な形態の毛を持つことで特徴づけられるビョウタケ目菌類（盤菌綱，子囊菌門）である。本科の主要部分を構成するのは *Lachnum* Retz. およびそれに形態が類似する属（ラクスム型菌類）である。本菌群からは複数の有用代謝物が報告されており，微生物資源として期待される（細矢，1997）。しかし，本菌群の分類形質の重み付けには議論があり，意見の一致をみていないため，分類学的には混乱状態にある（e. g. Dennis, 1949; Raitviir, 1970; Spooner, 1987; Raitviir, 1987a）。*Lachnum* にはこれまでに約170種が記載されている（Kirk *et al.*, 2001）。本属は有柄もしくは無柄の子囊盤を形成し，多細胞で先端まで顆粒に覆われる毛をもつのが特徴である。しかし，毛の形態は，無色あるいは有色，先端が膨張するものあるいは先端に向かって細くなるもの，先端に結晶状の構造や樹脂状の構造を有するものやもたないものなどが存在し，多様で

ある。さらに，子実層には槍形の側糸があるが，その形態は明瞭な槍形から糸状に近いものまで含まれ，長さも多様である。また，子実層を支える托は矩形菌組織であることが多いが，多角菌組織であることもある。子実層の色調も淡色から暗色まで存在し，他の形質状態とあわせ，分類形質として用いられている（e. g. Dennis, 1949; Raitviir, 1970; Spooner, 1987; Raitviir, 1987a）。

ヒアロスキファ科には，*Lachnum* の他に *Albotricha* Raitv., *Dasyscyphella* Tranzschel, *Lachnellula* P. Karst., *Trichopeziza* Fuckel, *Trichopezizella* Dennis ex Raitv. などの属が含まれる（Raitviir, 1987a）。これらの属は，基部が顆粒に覆われている毛をもつか，槍形の側糸をもつ点が *Lachnum* と共通する。ヒアロスキファ科が設立された際，設立者である Nannfeldt (1932) により，*Lachnum* の属概念が幅広く定義されたため，属内に多様な形態をもつ種を含むことになり，類縁菌類の一部は *Lachnum* に含まれた。ヒアロスキファ科の設立以降，*Lachnum* と類縁菌類の分類は，研究者によって分類形質の重み付けに差異があったことにより繰り返し改変されている（Dennis, 1949; Raitviir, 1970, 1987a）。この中で，*Lachnum* 属内の一部の種が新属と

E-mail: hosoya@kahaku.go.jp

して独立したり、別属へ組み替えられたりして、分類群の位置づけや分類群の範囲が変遷してきた (Dennis, 1949; Dennis, 1962; Korf, 1973) . *Lachnum* およびその類縁菌類の分類を整理し自然な分類を構築するためには、過去の分類体系において *Lachnum* に含まれていた類縁菌類も含めた分子系統解析によって系統関係を明らかにし、属の範囲を限定する必要があると考えられる。

近年, Cantrell & Hanlin (1997) により, rRNA 遺伝子 (rDNA) の ITS-5.8S 領域塩基配列を用いたヒアロスキファ科の分子系統解析が行われ, 系統関係の解明と, 過去の分類体系の妥当性についての検証が試みられた. ここには *Lachnum* 13種と類縁の3属 (*Lachnellula*, *Trichopeziza*, *Trichopezizella*) 3種が含まれていた. Cantrell & Hanlin (1997) は *Lachnum* が多系統群である可能性を示した. また *Lachnum*, *Lachnellula*, *Trichopeziza*, *Trichopezizella* と *Perrotia* Boud., *Proliferodiscus* J.H. Haines & Dumont が単系統群を形成し, Cantrell & Hanlin (1997) は, この単系統群を, ヒアロスキファ科の亜科, Lachnoideae として解釈した. 一方, Yu & Zhang (2003) も 18S rRNA 遺伝子塩基配列をもとにした解析から, *Lachnum* が多系統であることを示唆するデータを示している.

Cantrell & Hanlin (1997) の研究においては, 解析に用いた遺伝子が ITS-5.8S 領域のみであり, 属間の系統関係や系統樹の基部の部分の系統関係については解明されなかった. また, ヒアロスキファ科全体を解析の対象としていたため, *Lachnum* の類縁菌類は3種のみしか解析に含まれておらず, *Lachnum* とその類縁属の系統関係についても解明されなかった.

近年の子囊菌類の分子系統学的研究から, 属間, あるいは種間レベルでの系統解析において, 蛋白質をコードする遺伝子塩基配列の有用性が認められている (Liu & Hall, 2004; Hansen *et al.*, 2005). *Lachnum* およびその類縁菌類の系統関係を解明するためにも, 蛋白質をコードする遺伝子塩基配列を含めた分子系統解析を行うことが必要であると考えられる. また, *Lachnum* とその類縁菌類の分子系統解析は, Cantrell & Hanlin (1997) の研究以外には行われておらず, DNA データベースにも複数の領域の塩基配列が登録されていないため, 分子系統解析を行うためには独自で子実体サンプルを採集し, 純粋培養株を得る必要がある.

Lachnum とその類縁菌類には, 生理活性物質の生産も知られており (細矢, 1997), 生物資源としての活用を図るためにも, 自然分類体系の構築が望まれている. そこで, 本研究では日本産 *Lachnum* とその類縁菌類の系統関係を解明し, 系統に基づく分類体系を提

唱することを目的とし *Lachnum* と類縁菌類の収集および分子系統解析を行なった.

実験方法

材料採集および分離方法 材料は, 2005年4月から2007年6月にかけて, 日本各地の19地点にて採集した7属24種である. 採集した子囊盤から, スカーマン式マイクロマニプレータ (Skerman, 1968; 椿, 1978) を用いて単孢子分離を行い, 59株の純粋培養株を得た. 分離株は, ポテト・デキストロース・アガー (PDA, ニッスイ) 斜面培地にて培養した. 子囊盤は風乾して乾燥標本とし, 形態観察を行ない同定した. 乾燥標本は国立科学博物館菌類標本庫 (TNS) へ, 分子系統解析に用いた菌株は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門 (NITE Biological Resource Center, NBRC)) へ寄託した (表1).

形態観察 標本を70%エタノールで処理した後, Meltzer 試薬 (ヨウ素0.5g, ヨウ化カリウム20g, 抱水クロラル20g, 蒸留水20ml) もしくはラクトフェノールコットンブルーでマウントし, 光学顕微鏡1,000倍で分類に使用されている形態形質を観察した. また, 乾燥した子囊盤を70%エタノールおよび3% KOH で処理した後, 水で戻し, 凍結マイクロトームを用いて切片を作成し, 托の菌糸組織の構造の観察および子実層の形態 (Korf, 1973) を観察した. Raitviir (1987a, b) の分類体系に従い, Dennis (1949), Dharne (1965), Otani (1967), Raitviir (1970), Spooner (1987) の記載をもとに同定した.

DNA 抽出, PCR, シークエンス反応 2% Malt Extract 培地にて2週間培養した菌体約50mgを, 直径3mmと直径1mmのセラミックビーズとともに2mlのエッペンドルフチューブに入れ, -80°C で凍結させた. 凍結した菌体を Qiagen Tissue Lyser を用い破碎した後, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い, 製品のプロトコルに従ってゲノムDNAを抽出した.

得られたゲノムDNAを鋳型とし, 核の ITS-5.8S rDNA, LSU rDNA の D1/D2 領域の一部および RPB2 の一部を PCR 反応により増幅した. プライマーは, ITS-5.8S 領域の増幅には ITS1F/ITS4 (Gardes & Bruns, 1993, White *et al.*, 1990) を, D1/D2 領域の増幅には NL1/NL4 (O'Donnell, 1993) を, RPB2 (second largest subunit of RNA polymerase II) の増幅には rRPB2-5F/ RPB2-P7R, RPB2-P6F/ RPB2-P7R, RPB2-

Table 1 Taxa analyzed in the present study.

Isolate no.	TNS-F-no.	NBRC No	Species	Locality	Substrate	Collecting date
FC-2243	16682	104372	<i>Albotricha acutipila</i> (P. Karst.) Raitv.	Oirase, Aomori	stem of bamboo grass	5/26/2006
FC-2262	16740	104380	<i>Albotricha acutipila</i> (P. Karst.) Raitv.	Sugadaira, Nagano	stem of bamboo grass	6/17/2006
FC-2094	16497	101346	<i>Albotricha albotestacea</i> (Desm.) Raitv.	Sugadaira, Nagano	stem of <i>Miscanthus</i>	5/18/2005
FC-2261	16730	104379	<i>Albotricha albotestacea</i> (Desm.) Raitv.	Sugadaira, Nagano	stem of <i>Miscanthus</i>	6/17/2006
FC-2190	16624	104363	<i>Albotricha</i> sp. 1	Sugadaira, Nagano	stem of bamboo grass	9/29/2005
FC-2282	16771	104384	<i>Albotricha</i> sp. 1	Sugadaira, Nagano	stem of bamboo grass	9/24/2006
FC-2013	16439	101335	<i>Dasyscyphella longistipitata</i> Hosoya	Yamakita, Kanagawa	cupule of <i>Fagus crenata</i>	4/17/2005
FC-2018	16433	101336	<i>Dasyscyphella longistipitata</i> Hosoya	Mt. Tanzawa, Kanagawa	cupule of <i>Fagus crenata</i>	4/16/2005
FC-2031	16466	101338	<i>Dasyscyphella montana</i> Raitv.	Sugadaira, Nagano	wood	4/29/2005
FC-2070	16527	102336	<i>Dasyscyphella montana</i> Raitv.	Sugadaira, Nagano	wood	5/21/2005
FC-2209	16701	104367	<i>Dasyscyphella</i> sp. 1	Mayagatai, Aomori	wood	5/27/2006
FC-2034	16462	101339	<i>Lachnellula occidentalis</i> (G.G. Hahn & Ayers) Dharne	Kakuma, Nagano	twig (coniferous wood)	4/29/2005
FC-2067	16513	101342	<i>Lachnellula occidentalis</i> (G.G. Hahn & Ayers) Dharne	Sugadaira, Nagano	twig (coniferous wood)	5/19/2005
FC-2304	16450	102346	<i>Lachnellula resinaria</i> (Willd.) Dharne	Itako City, Ibaraki	coniferous wood	2006
FC-2354	16812	104388	<i>Lachnellula subtilissima</i> (Cooke) Dennis	Mt. Shirane, Gunma	twig (coniferous wood)	6/8/2007
FC-2110	16529	101348	<i>Lachnellula suecica</i> (de Bary ex Fuckel) Nannf.	Sugadaira, Nagano	twig of <i>Larix kaempfer</i>	5/21/2005
FC-2147	16582	104360	<i>Lachnum abnorme</i> (Mont.) J.H. Haines & Dumont	Yamakita, Kanagawa	wood	7/2/2005
FC-2172	16617	104362	<i>Lachnum abnorme</i> (Mont.) J.H. Haines & Dumont	Yamakita, Kanagawa	twig	7/3/2005
FC-2056	16494	101341	<i>Lachnum asiaticum</i> (Y. Otani) Raitv.	Sugadaira, Nagano	stem of bamboo grass	5/18/2005
FC-2294	16758	102344	<i>Lachnum ciliare</i> (Schröd.) Rehm	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Quercus crispula</i>	9/22/2006
FC-2295	16759	102345	<i>Lachnum ciliare</i> (Schröd.) Rehm	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Quercus crispula</i>	9/22/2006
FC-2197	16637	104364	<i>Lachnum fuscescens</i> (Pers.) P. Karst.	Agatsuma, Gunma	leaf of <i>Lindera obtusiloba</i>	4/27/2006
FC-2200	16635	104365	<i>Lachnum fuscescens</i> (Pers.) P. Karst.	Agatsuma, Gunma	leaf	4/27/2006
FC-2323	17632	102347	<i>Lachnum longispineum</i> Hosoya & Issh. Tanaka	Sendai, Miyagi	leaf of <i>Lyonia ovalifolia</i>	7/29/2006
FC-2212	16651	104369	<i>Lachnum nudipes</i> (Fuckel) Nannf.	Mt. Iwaki, Aomori	stem of <i>Fallopia</i>	5/24/2006
FC-2216	16709	104370	<i>Lachnum nudipes</i> (Fuckel) Nannf.	Yuzawa, Niigata	stem of bamboo grass	5/12/2006
FC-2058	16501	102335	<i>Lachnum pudibundum</i> (Qué.) J. Schröt.	Sugadaira, Nagano	wood	5/18/2005
FC-2025	16451	101337	<i>Lachnum pulverulentum</i> P. Karst.	Itako, Ibaraki	leaf of <i>Pinus densiflora</i>	4/19/2005
FC-2283	16769	104385	<i>Lachnum radiatum</i> Issh. Tanaka & Hosoya	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Fagus crenata</i>	9/24/2006
FC-2286	16764	102343	<i>Lachnum radiatum</i> Issh. Tanaka & Hosoya	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Fagus crenata</i>	9/23/2006
FC-2093	16545	101345	<i>Lachnum rhytismatis</i> (W. Phillips) Nannf.	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Symplocos coreana</i>	5/23/2005
FC-2165	16544	101354	<i>Lachnum rhytismatis</i> (W. Phillips) Nannf.	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Symplocos coreana</i>	5/23/2005
FC-2054	16487	104357	<i>Lachnum soppittii</i> (Masse) Raitv.	Kakuma, Nagano	leaf of <i>Quercus serrata</i>	5/17/2005
FC-2160	16551	104361	<i>Lachnum soppittii</i> (Masse) Raitv.	Mt. Tsukuba, Ibaraki	leaf	5/28/2005
FC-1290	17631	102332	<i>Lachnum varians</i> (Rehm) Spooner	Yakushima, Kagoshima	fern	10/23/2005
FC-2137	16583	104358	<i>Lachnum virgineum</i> (Batsch) P. Karst.	Yamakita, Kanagawa	wood	7/2/2005
FC-2143	16588	104359	<i>Lachnum virgineum</i> (Batsch) P. Karst.	Yamakita, Kanagawa	wood	7/2/2005
FC-2117	16442	102339	<i>Lachnum</i> sp. 1	Sugadaira, Nagano	wood	5/18/2005
FC-2211	16642	104368	<i>Lachnum</i> sp. 1	Mt. Tsukuba, Ibaraki	stem of bamboo grass	5/2/2006
FC-2248	16690	104374	<i>Lachnum</i> sp. 4	Towada-ko, Akita	stem of <i>Fallopia</i>	5/26/2006
FC-2273	16691	104382	<i>Lachnum</i> sp. 4	Towada-ko, Akita	stem of <i>Fallopia</i>	5/26/2006
FC-2202	16634	104366	<i>Lachnum</i> sp. 5	Agatsuma, Gunma	leaf of <i>Fagus crenata</i>	4/27/2006
FC-2076	16520	102337	<i>Lachnum</i> sp. 9	Sugadaira, Nagano	stem of bamboo grass	5/21/2005
FC-2260	16715	104378	<i>Lachnum</i> sp. 9	Mt. Tsukuba, Ibaraki	leaf	6/14/2006
FC-2234	16673	104371	<i>Lachnum</i> sp. 10	Oirase, Aomori	twig	5/25/2006
FC-2264	16722	104381	<i>Lachnum</i> sp. 11	Sugadaira, Nagano	petiole of <i>Pterocarya</i>	6/17/2006
FC-2252	16681	104375	<i>Lachnum</i> sp. 12	Oirase, Aomori	leaf	5/26/2006
FC-2253	16675	104376	<i>Lachnum</i> sp. 12	Oirase, Aomori	leaf	5/25/2006
FC-2355	16838	104389	<i>Lachnum</i> sp. 13	Tsukuba, Aomori	leaf of evergreen wood	6/15/2006
FC-2358	16841	104390	<i>Lachnum</i> sp. 13	Mt. Tsukuba, Ibaraki	leaf of evergreen wood	6/23/2007
FC-2244	16680	104373	<i>Lachnum</i> sp. 14	Oirase, Aomori	<i>Equisetum hyemale</i>	5/26/2006
FC-2079	16535	101344	<i>Lachnum</i> sp. 15	Sugadaira, Nagano	leaf of <i>Quercus crispula</i>	5/21/2005
FC-2270	16667	102341	<i>Lasiobolium lonicerae</i> (Alb. & Schwein.) Raitv.	Seisyurindou, Aomori	wood	5/24/2006
FC-2285	16760	102342	<i>Trichopeziza mollissima</i> (Lasch) Fuckel	Sugadaira, Nagano	stem of herb	9/22/2006
FC-2288	16763	104386	<i>Trichopeziza mollissima</i> (Lasch) Fuckel	Sugadaira, Nagano	stem of herb	9/23/2006
FC-2156	16579	101353	<i>Trichopezizella otanii</i> J.H. Haines	Tyujyabaru, Oita	stem of <i>Fallopia</i>	6/22/2005
FC-2345	16833	104387	<i>Trichopezizella otanii</i> J.H. Haines	Sugadaira, Nagano	stem of herb	6/10/2007
FC-2255	16686	104377	<i>Trichopezizella</i> sp. 1	Towada-ko, Akita	stem of herb	5/26/2006
FC-2274	16684	104383	<i>Trichopezizella</i> sp. 1	Towada-ko, Akita	stem of herb	5/26/2006
FC-2038	16472	104355	<i>Hymenoscyphus varicosporoides</i> Tubaki	Kasumigaura, Ibaraki	wood	5/5/2005

P6Fa/ fPRB2-7cR (Hansen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999) を, β -tubulin の増幅には Bt1a/Bt1b および Bt2a/Bt2b (Glass and Donaldson, 1995) を用いた. いずれも Ex-Taq (TaKaRa) を用い, 全液量 10 μ l で反応させた. PCR の反応条件は, それぞれの遺伝子について以下のように設定した. ITS-5.8S 領域および D1/D2 LSU rDNA: 初めに 95°C で 3 分間変性させ, アニーリング 50°C 30秒, 伸長 72°C 2 分, 変性 95°C 30秒を 30 サイクル繰り返し, 最後に 72°C で 10 分間伸長させた. RPB2: 初めに 95°C で 3 分間変性させた後, 変性 95°C 45秒, アニーリング 52°C 40秒, 伸長 74°C 2 分を 25 サイクル繰り返した. その後, 同じ温度条件で伸長時間のみ 1 サイクルごとに 5 秒延長して反応を 25 サイクル繰り返し, 最後に 72°C で 10 分間伸長させた. β -tubulin: 初めに 94°C で 1 分間変性させ, 変性 94°C 1 分, アニーリング 58°C 1 分, 伸長 72°C 1 分を 30 サイクル繰り返し, 最後に 72°C で 7 分間伸長させた.

PCR 増幅産物の精製には, 4 μ l に対して Exo-sap IT (USB Corporation) 0.6 μ l を加え, サーマルサイクラーで 37°C 30分, 80°C 15分インキュベートし, 精製した. PCR 精製産物を用い, ダイレクトシーケンスを行った. シーケンス反応は, Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 以下のような反応条件で行った. 初めに 95°C で 3 分間変性させ, 変性 95°C 10秒, アニーリング 50°C 10秒, 伸長 60°C 4 分を 25 サイクル繰り返した後, 60°C で 10 分間変性させた. プライマーは, PCR 反応と同一のプライマーを用いた. 反応生成物は, エタノール沈殿により精製し, ABI 3130xl (Applied Biosystems) を用いシーケンスした. 得られた塩基配列は, 配列編集ソフト SeqMan (Lasergen v6 DNASTAR) により両方向の配列を照合させ, 2 方向からの配列が得られた部分を決定し使用した.

分子系統解析 各遺伝子のデータセットを, Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いてアラインメントした後, さらに手動で修正を行った. 得られたデータセットをもとに, ソフトウェア MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を用い, 近隣結合法 (Neighbor-joining method: NJ 法) (Saitou & Nei, 1987), 最大節約法 (Most parsimonious method: MP 法) にて系統樹を作成した. また, 各遺伝子の連結したデータセットについては, ベイズ法 (Bayesian method) による系統樹も作成した. 近隣結合法の距離モデルには, Kimura の二変数法を用いた. 最大節約法による解析では, 発見探索法により系統樹を作成した. その際, 逐次追加選択 (step-addition option) は, 無作為 (random) を

選択し, 反復を 100 とした. 分枝変換アルゴリズム (Branch-swapping algorithm) には, Tree-Bisection-Reconnections (TBR) を用いた. 枝の信頼性を検定するため, ブートストラップ検定を行い, ランダムサンプリングは 1,000 回反復した. ブートストラップ値 (BP 値) 80% 以上の枝を, 信頼性の高い枝と解釈した.

それぞれの遺伝子のデータセットをもとに系統樹を作成した後, 遺伝子を連結して系統解析を行うために, PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) により Incongruence Length Difference Test (ILD テスト, Farris *et al.*, 1995) を行い, 4 つの遺伝子間の整合性を検定した. 可能な全ての組み合わせで ILD テストを行い, 整合性が認められた D1/D2 領域と RPB2 の塩基配列を連結した領域のデータセットを連結し, 系統解析を行った. ベイズ法による系統解析には, Mr Bayes 3.1.2b (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) を用いた. 解析を行う際には, Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) により, モデルテストを行い, 赤池情報基準 (AIC) を使用して最適なモデルを選択した. GTR+G+I モデルを使用し, ランダムツリーを初期系統樹として, マルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC 法) による 4 本のマルコフ連鎖を 300 万世代繰り返し (Average Standard Deviation of Split Frequencies, ASDSF < 0.03), 100 世代ごとに系統樹をサンプリングした. データセットでは, 22501 個の系統樹から 50% 合意樹を作成した. また, 信頼性の評価には事後確立 (posterior probability: PP) を用いた.

全ての解析において, *Hymenoscyphus varicosporoides* Tubaki を外群として用いた. 現在までに, ビョウタケ目菌類について多くの分子系統学的研究が行われてきたが (Lutzoni *et al.*, 2004; Spatafora *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), ヒアロスキファ科とその周縁の科の系統関係は解明されておらず, 本科と姉妹群の関係にある分類群は明らかになっていない. また, 高次の系統解析を目的とした研究においてはタクソンサンプリングが粗くなるため, このような研究から科内レベルでの系統解析に適した外群を探索することは困難である. そこで, 本研究ではヒアロスキファ科とは明らかに異なる分類群に属し, 同じビョウタケ目に所属する *H. varicosporoides* を外群に用いた.

結 果

本研究では, 未同定種も含めているが, いずれも Raitviir (1987a, b) の属概念にもとづいて, 属レベルまで同定し, 矩形菌組織の托と全面が顆粒に覆われた毛をもつ子嚢盤については毛の有色・無色に関わら

Table 2 Characteristics of the datasets and phylogenetic trees inferred from each gene.

Gene	Genus	Species	Isolates	Sequence length (bp) ^{a)}	Conserved sites ^{b)} (bp)	Valuable sites ^{c)} (bp)	Informative sites in MP (bp)	Informative sites in MP (%)	Number of MP trees	Tree length in MP	Consistency index (CI)	Retention index (RI)
ITS-5.8S rRNA	7	23	59	469	265	201	163	34.8	6	536	0.3899	0.7134
28S D1D2	7	23	37	509	410	99	62	12.2	32	268	0.5075	0.7007
RPB2	7	23	37	643	357	286	259	40.3	3	1747	0.2828	0.4673
β -tubulin	7	21	35	806	525	280	235	29.2	3	1207	0.3256	0.4697
D1/D2 + RPB2	7	23	37	1151	765	386	321	27.9	2	2028	0.3111	0.4998

a) Including gap.

b) Sites without substitutions.

c) Sites with substitutions.

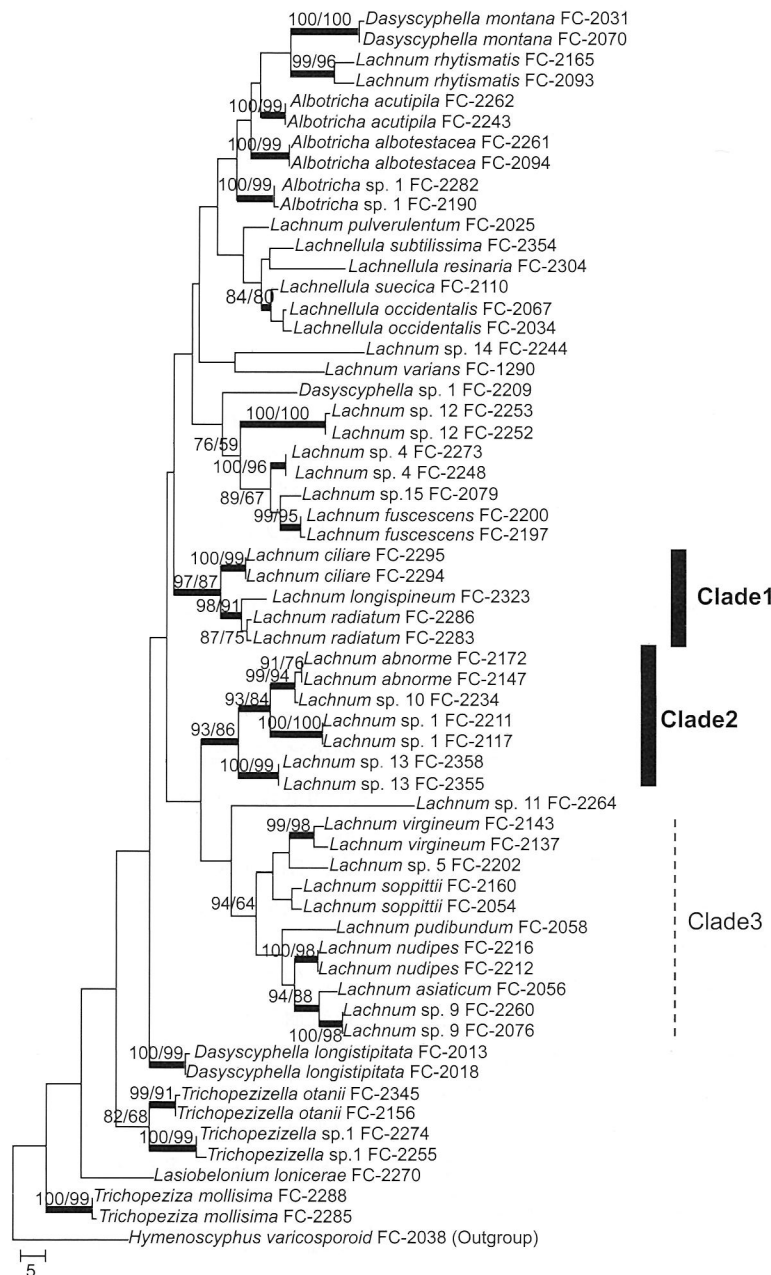


Fig. 1 One of the six equally maximum parsimonious trees of *Lachnum* and its allied fungi inferred from gene sequences of ITS and 5.8S rRNA. CI=0.389925, RI=0.713409. Clades supported by bootstrap values above 80% are indicated as thickened lines with BP of 1000 replications followed by BP of 1000 replications in neighbor-joining analysis. Clade 3 with less strongly support in neighbor-joining analysis is indicated by broken line, while clades 1 and 2 are indicated by thickened lines at the right. Bar=5 base changes.

Table 3 A summary of the clades commonly generated in using phylogenetic analyses based on four genes and one combined data.

Clade	Species	ITS-5.8S		D1/D2		RPB2		β -tubulin		D1/D2 +RPB2		
		NJ	MP	NJ	MP	NJ	MP	NJ	MP	NJ	MP	Bayes
1	<i>Lachnum radiatum</i> , <i>L. longispineum</i> , <i>L. ciliare</i>	97	87	99	99	100	100	100	99	100	100	1.00
2	<i>Lachnum abnorme</i> , <i>Lachnum</i> sp. 1, <i>Lachnum</i> sp. 13, (<i>Lachnum</i> sp. 10)	93	86	96	91	<80	<50	<80	<80	97	96	1.00
3	<i>Lachnum vrigineum</i> , <i>L. soppittii</i> , <i>L. nudipes</i> , <i>L. asiaticum</i> , <i>Lachnum</i> sp. 5, <i>Lachnum</i> sp. 9, <i>L. pudibundum</i> , (<i>Lachnum</i> sp. 10)	94	<80	99	97	ND	<50	ND	ND	95	94	1.00
4	<i>Lachnum</i> sp. 14, <i>L. rhytmatis</i>	ND	<50	96	90	100	100	<80	<80	100	100	1.00
5	<i>Lachnum fuscescens</i> , <i>Lachnum</i> sp. 15, <i>Lachnum</i> sp. 12, <i>Lachnum</i> sp. 4	<80	<80	97	92	99	99	99	99	100	100	1.00
6	<i>Lachnellula occidentalis</i> , <i>Lachnellula suecica</i> , <i>Lachnellula resinaria</i> , <i>Lachnum pulverulentum</i> , <i>Lachnellula subtilissima</i>	<80	<80	<50	<50	98	87	98	98	99	93	1.00
7	<i>Albotricha acutipila</i> , <i>A. albotestacea</i> , <i>Albotricha</i> sp. 1	<50	ND	<80	ND	100	99	85	85	100	100	1.00

For NJ and MP tress, bootstrap values are presented. For Bayesian analysis, posterior probability is presented.

ND: not generated in the given analysis.

Table 4 ILD test scores (P values) carried out on every combination of the four genes sequenced in the present study.

	ITS-5.8S	D1/D2	RPB2	β -tubulin
ITS-5.8S				
D1/D2	0.001 ^{a)}			
RPB2	0.001 ^{a)}	0.380		
β -tubulin	0.001 ^{a)}	0.002 ^{a)}	0.001 ^{a)}	

^{a)}Significantly different.

ず、*Lachnum* と同定した。これらの中には、新種と考えられるものが含まれており、別途公表予定である。

ITS-5.8S 塩基配列データを用いた系統解析 7 属 23 種 59 菌株の ITS-5.8S 塩基配列を読み取り、469 bp のデータセットを得て (Table 2), NJ 法 および MP 法 により系統樹を作成した。MP 法 では、同じ樹長の系統樹が 6 個得られ、そのうちの 1 つを示した (Fig. 1)。NJ 法, MP 法の両方の系統樹において、同種と同定したサンプルの塩基配列が高い相同性をもち、単系統群を形成し高い BP 値で支持された。

NJ 法, MP 法の両方において、BP 値 80% 以上で支持され、それぞれが複数種で構成される 2 つの単系統群、クレード 1 とクレード 2 がみとめられた。クレード 1 は、*Lachnum radiatum*, *Lachnum longispineum*, *Lachnum ciliare* の 3 種を含み、クレード 2 は *Lachnum abnorme*, *Lachnum* sp. 10, *Lachnum* sp. 1, *Lachnum* sp. 13 の 4 種を含んでいた。また、NJ 法の系統樹において、BP 値 94% で支持される単系統群、クレード 3

がみとめられた。クレード 3 は、*Lachnum* の基準種である *L. virigineum* に加え、*L. soppittii*, *L. pudibundum*, *L. nudipes*, *L. asiaticum*, *Lachnum* sp.5, *Lachnum* sp. 9 を含む単系統群であった。クレード 3 の樹形は、MP 法系統樹においてもみとめられるが、BP 値は 64% であった。ITS-5.8S 塩基配列による系統樹では、80% 以上の BP 値で支持される単系統群の数が 3 つであり、これは他の遺伝子の系統樹と比較し、最も少なかった (Table 3)。

他の遺伝子塩基配列による系統解析 D1/D2 領域, β -tubulin, RPB2 のそれぞれにおいて、7 つの単系統群、クレード 1 ~ クレード 7 がみとめられ、多くの場合、BP 値 80% 以上で支持された (Table 3)。7 つの単系統群では、解析に用いた配列によってクレード 2 あるいはクレード 3 に含まれた *Lachnum* sp. 10 を除き、各クレードの構成種は一致した。 β -tubulin 遺伝子系統樹において、クレード 6 とクレード 7 が姉妹群の関係を示したが、他の遺伝子の系統樹においては、クレード 6 とクレード 7 が姉妹群となることはなかった。他のクレードについては、本研究で作成した全ての系統樹において、系統関係が明らかにならなかった。

2 遺伝子塩基配列の連結データセットに基づく系統解析 シークエンスを行なった 4 つの遺伝子から、2 遺伝子ずつ組み合わせて連結データセットを作成し、ILD テストを行った (Table 4) 結果、6 通りの組み合わせのうち、D1/D2 領域と RPB2 領域の遺伝子にのみ整合性がみとめられた。この 2 つの遺伝子を連結して、

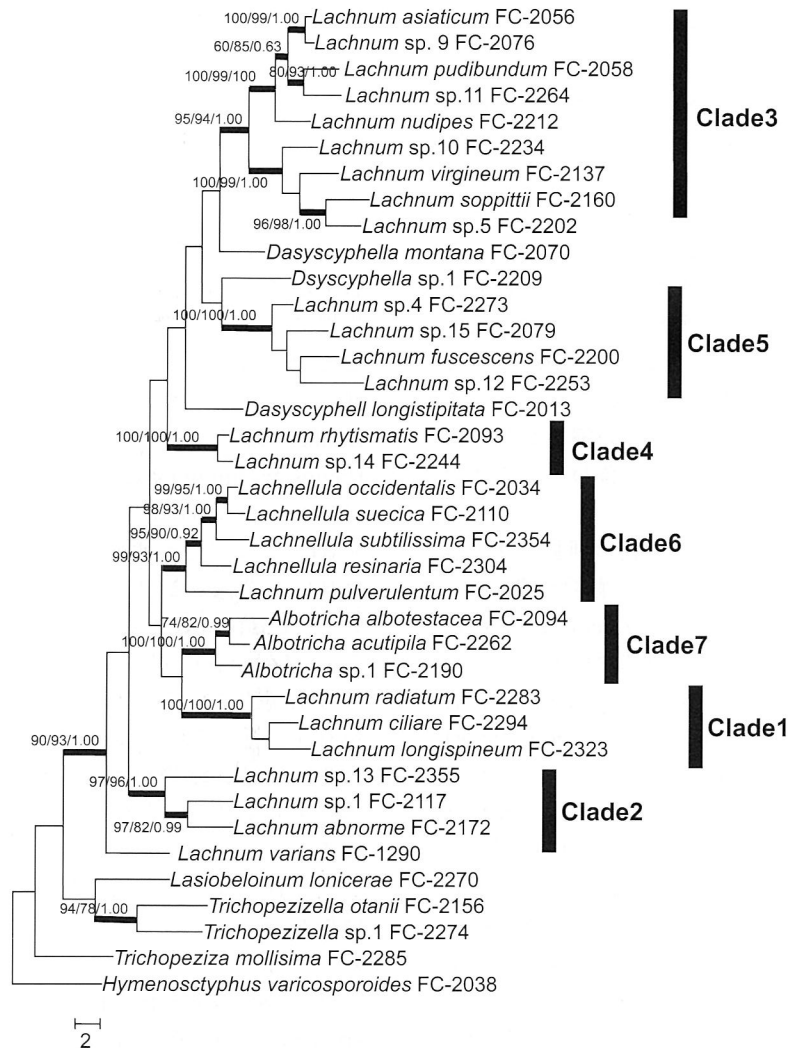


Fig. 2 One of the two equally maximum parsimonious trees of *Lachnum* and its allied fungi inferred from sequences of combined data of D1/D2 LSU rRNA and RPB2 genes. CI=0.311144, RI=0.49982. Clades supported by bootstrap values above 80% are indicated as thickened lines with BP of 1000 replications followed by BP of 1000 replications in neighbor-joining analysis and posterior probability in Bayesian analysis. Bar=2 base changes.

7属23種37菌株からギャップを除いた D1/D2 領域 415 bp と RPB2 領域 508 bp によって計1151 bp のデータセットを作成し、NJ 法、MP 法およびベイズ法にて系統樹を作成した (Fig. 2)。NJ 法、MP 法の両方の系統樹において、他の遺伝子単独で解析した場合にみとめられた 7 つの単系統群の全てがみとめられ、いずれも BP 値 90% 以上で支持された。7 つの単系統群は、ベイズ法による系統樹においても認められ、PP 値 1.00 で支持された。また、*Trichopezizella*、*Trichopeziza*、*Lasiobelonium* を除く、*Lachnum* とその類縁菌類の単系統群が BP 値 90% 以上および PP 値 1.00 で支持された。しかし、各クレード間の枝は BP 値および PP 値によ

る支持が得られず、みとめられたクレード間の系統関係は明らかにならなかった。

考 察

各属の分類学的再検討

1) *Incrucipulum* (クレード 1)

Lachnum ciliare、*L. longispineum*、*L. radiatum* からなるクレード 1 は、本研究で構築したすべての分子系統樹においてみとめられ、BP 値 80% で支持された (Table 3, Figs. 1, 3)。この 3 種は、全て落葉に生息している。これまでに、*L. ciliare* はクヌギ属 (*Quercus*)

植物の落葉, *L. longispineum* はネジキ *Lyonia ovalifolia* の落葉, *L. radiatum* はブナ *Fagus crenata* の落葉のみから報告されており (Dennis, 1949; Tanaka and Hosoya, 2001), 基質に対する選択性が高いと考えられる. クレード1に含まれる3種は, 白色で有柄の小型の子囊盤を形成し, *L. radiatum* と *L. longispineum* は子囊盤の大きさに比べて, 非常に長い毛を有する. また, *L. longispineum* は極端に厚壁なスパイク状の毛を形成する. 一方, *L. ciliare* は細胞壁の厚い, 短い毛を有する. 毛の長さ, 細胞壁の厚さは異なるが, これら3種は共通して毛の先端に明瞭な結晶物を有する. さらに, 托の細胞壁が厚く, 正方形に近い細胞が石畳状に配列することや, 托の細胞が顆粒に覆われることでも, 共通している.

Baral & Krieglsteiner (1985) は, 托の細胞の壁が厚く, 石畳状に配列し, 托細胞の表面が顆粒に覆われ, さらに毛の先端に結晶を有する種を *Lachnum* から独立させ, *I. ciliare* (Schr.) Baral を基準種として新属 *Incrucipulum* を新設した. *Incrucipulum* は, *I. virtembergense* (Matheis) Baral, *I. capitatum* (Peck) Baral, *I. sulphurellum* (Peck) Baral を含み, いずれも正方形の細胞が石畳状に配置し, 表面が顆粒に覆われる托および先端に結晶を持つ毛を有する菌類である. 本研究の結果, *I. ciliare* を含み, 細胞が石畳状に配置し, 表面が顆粒に覆われる托および先端に結晶を持つ毛を有する種類が単系統群を形成し, *Lachnum* の基準種である *L. virgineum* を含む単系統群 (クレード3) と系統的に区別できることが明らかになった (Fig. 2). 本研究では, *Incrucipulum* 4種のうち, *L. ciliare* のみを解析に用いた. 厳密には, *Incrucipulum* に分類された他の3種を加えて, 分子系統解析を行うことが必要である. しかし, *L. radiatum* および *L. longispineum* の形態が *Incrucipulum* の定義と一致し, *L. ciliare* とともに単系統群を形成することから, 托の形態と毛の結晶によってまとめられる *Incrucipulum* は自然な分類群であると考えられる. Raitviir (1987a) は, *Incrucipulum* を *Lachnum* 属の節としたが, *Lachnum* を自然な分類群とするためには, *Incrucipulum* をみとめ, *L. radiatum* および *L. longispineum* を *Lachnum* から独立させ, *Incrucipulum* に移籍させる必要がある.

2) *Lachnum* (クレード2-4)

Lachnum はクレード2, 3, 4の3つのクレードにまたがり, 単系統性は支持されなかった. クレード2は, *L. abnorme*, *Lachnum* sp.1, *Lachnum* sp.13からなる単系統群であり, 6つの系統樹においてBP値80%以上で支持された (Table 3). *Lachnum abnorme* は分解

の進んだ材を基質とするが, 生きた樹木に寄生的に発生する場合もある (三好ら, 2007; 貞野ら, 1998). 一方, *Lachnum* sp.1 はササ類の茎を, *Lachnum* sp.13 は照葉樹の落葉を基質として腐生的に発生し, 本クレードの菌の基質や生態は多様である. *Lachnum abnorme* および *Lachnum* sp.1 の子囊胞子は, 多細胞で糸状であり, *Lachnum* sp.13 のそれは単細胞であるが, 子囊胞子が糸状であることが共通している. 加えて, 毛の先端には結晶や樹脂状物を欠き, 子実層は黄色であることや, 側糸が糸状に近い幅の狭い槍形であることが共通している. *Lachnum abnorme* は, Cantrell & Hanlin (1997) において, *Lachnum brasiliense* (Mont.) Haines & Dumont, *Lachnum sclerotii* (A.L. Sm.) Haines & Dumont, *Lachnum euterpes* Cantrell & Haines とBP値84%で支持される単系統群を形成した. これら3種は長い子囊胞子と幅の狭い側糸を持つことで共通している. Cantrell & Hanlin (1997) および本研究の結果から, *Lachnum* の基準種を含む単系統群 (クレード3) とは系統的に区別できる長い子囊胞子や幅の狭い側糸を有する種からなる単系統群が存在することが示唆される. *Lachnum* を自然分類群とするためにも, 属概念の限定および整理を行い, 定義から外れる種を独立させることが重要であり, 今後, クレード2に含まれるような長い胞子と糸状の側糸を持つ菌についてさらに解析を行い, 妥当な分類学的位置付けが必要と考えられる.

ITS-5.8S の系統樹 (Fig. 1) においては, *Lachnum* sp.10 はこの単系統群に含まれたが, 他の遺伝子の系統樹および2遺伝子を用いた系統樹 (Fig. 2) においては, クレード3に含まれた. また, ITS-5.8S 領域以外の系統樹においては, *Lachnum* sp.10は, ITS-5.8S 領域ではクレード2に含まれており, クレード2とクレード3が連続的である可能性も考えられる. *Lachnum* sp.10 は一隔壁の子囊胞子を持ち, 側糸も細い槍形であるが, *Lachnum* の定義には合致しているため, 現段階では, *Lachnum* に分類するのが妥当だが, さらに検討する必要がある.

クレード3は, *Lachnum* の基準種である *L. virgineum* に加え, *L. sopppittii*, *L. pudibundum*, *L. nudipes*, *L. asiaticum*, *Lachnum* sp.5, *Lachnum* sp.9, *Lachnum* sp.10, *Lachnum* sp.11 からなる単系統群で, 5つの系統樹においてBP値80%以上で支持された (Fig. 2, Table 3). クレード3に含まれる種類の基質はクレード内で多様であるが (Table 1), 有柄の子囊盤を形成することや毛の先端に大型の結晶をもたないことで共通している. 加えて, 托の細胞が矩形菌組織から多角菌組織であることや, 側糸が槍形であること,

楕円形から紡錘形の胞子を形成することも共通する。クレード3に含まれた種のうち、*L. virgineum*, *L. nudipes*, *L. pudibundum*, *L. sopittii* は、Dennis (1949) の分類体系において *Typicae* 節に含まれており、*L. asiaticum*, *Lachnum* sp. 5, *Lachnum* sp. 9, *Lachnum* sp. 10, *Lachnum* sp. 11 も *Typicae* 節に該当する形態を有する種である。本研究では、Dennis (1949) によって *Typicae* 節に分類されていた *Lachnum rhytismatis* も解析に加えているが、本種はクレード3に含まれず、*Lachnum* sp. 14 とともにクレード4を形成した。*L. rhytismatis* は毛の先端に大型の結晶を有する点で、クレード3に分類された菌類と異なっている。*L. rhytismatis* を除外すると、クレード3はDennis (1949) によって典型的な *Lachnum* と解釈された分類群を含む単系統群である。

本研究で作成した系統樹において、*Lachnum* は複数の単系統群（クレード1～クレード5）を形成し、一つにまとまることはなかった。Nannfeldt (1932) が属概念を幅広く定義したことにより、*Lachnum* は多様な形態の種を含んでおり、多系統であることが推定されるが、本研究の結果は、Cantrell & Hanlin (1997) や Yu & Zhuang (2003) の結果と同様に、*Lachnum* が多系統的であることを示した。*Lachnum* を自然分類群とするためには、クレード2、クレード4のように、*Lachnum* の基準種を含む単系統群（クレード3）と区別でき、形態的差異が認められる種を *Lachnum* から除き、今後新たな分類群として扱っていくことが必要であると考えられる。しかし、少数の種しか扱っていない現段階では、基準種を含むクレード3に基づき、狭義の *Lachnum* が再定義できる可能性を指摘するにとどめる。本研究の結果により、狭義の *Lachnum* は「有柄の子囊盤を形成し、楕円形から紡錘形の子囊胞子を形成し、側糸が槍形で、毛の先端に大型の結晶をもたない、矩形菌組織から多角菌組織の托をもつ」と定義するのが望ましいと考えられる。また、Dennis (1949) は、毛の先端の結晶の有無を重視しなかったが、*L. rhytismatis* がクレード3に含まれなかったことから、結晶の有無は重要な形質と考えられる。

クレード4は、*L. rhytismatis* および *Lachnum* sp. 14 の2種からなる単系統群であり (Fig. 2), 7つの系統樹 (Table 3) においてみとめられ、BP 値80%以上で支持された。*L. rhytismatis* は、落葉を基質とし、有柄で白色の小型の子囊盤を形成する。毛の先端は円筒形で大きな結晶を有し、側糸は明瞭な槍形、子囊胞子は紡錘形である。*Lachnum* sp. 14 は、トクサ (*Equisetum hyemale*) を基質とし、ごく短い柄をもつ白色で小型の子囊盤を形成する。毛の先端は円筒形もしくはやや先

鋭で、かぎ状に湾曲し、結晶を欠く。側糸はやや幅の狭い槍形で、子囊胞子は紡錘形からしずく型である。クレード4のみがもつ共有派生形質は特定できなかったため、これらに対して新分類群を提唱することはできず、当面 *Lachnum* におくのが妥当である。

3) *Brunnipila* (クレード5)

クレード5は、*L. fuscescens*, *Lachnum* sp. 12, *Lachnum* sp. 15, *Lachnum* sp. 4 からなる単系統群である (Fig. 2)。*Lachnum fuscescens*, *Lachnum* sp. 12, *Lachnum* sp. 15 は、落葉に生息するが、*Lachnum* sp. 4 は、草本の茎を基質として腐生的に発生し、本クレードを構成する菌の基質は多様である。クレード5に含まれる4種は、いずれも茶褐色の毛で覆われ、クリーム色の子実層を有する、有柄の子囊盤を形成する。毛は褐色から茶褐色で、先端のみ無色もしくは淡色であり、毛の先端には結晶を有することが共通している。また、側糸が明瞭な槍形であり、紡錘形の単細胞の子囊胞子を有することも共通している。

Baral & Krieglsteiner (1985) は、Dennis (1949) の設けた *Brunneolae* 節を属のレベルに格上げし、新属 *Brunnipila* を設けた。*Brunnipila* は、有柄の子囊盤を形成し、子囊盤の外側が淡褐色から暗褐色の毛で覆われ、毛の先端に結晶をもつ種類を含み、クレード5に含まれる分類群に一致する。

Brunnipila は Raitviir (1987b) によって再び *Lachnum* 属内の節に格下げされたが、本研究の結果より、*Brunnipila* は妥当な分類群であることが示された。従って、クレード5に対し *Brunnipila* 属を適用すべきである。

4) *Lachnellula* (クレード6)

クレード6は、*Lachnellula occidentalis*, *L. suecica*, *L. resinaria*, *L. subtilissima* に加え、*Lachnum pulverulentum* を含む単系統であり、本研究で構築した系統樹のうち、6つの系統樹において高く支持され、*Lachnellula* 属の分類群はすべてこのクレードに含まれた (Table 3)。クレード6に含まれる5種は、針葉樹を基質とし、無柄もしくはほぼ無柄の子囊盤を形成する。子囊盤の表面は粗い顆粒をもつ毛に覆われ、子実層は黄色から黄橙色であることが共通する。クレード6において、*Lachnellula* が単系統群を形成したことより、*Lachnellula* が自然な分類群であることが示された。

Lachnellula は Nannfeldt (1932) の分類体系においては、ビョウタケ科に含まれ、Dennis (1962) がヒアロスキファ科の *Lachneae* 連に移した後にも、Dharne (1965) はその分類学的位置付けに反対していた。ま

た, Korf (1973) は, ヒアロスキファ科に2つの亜科, Trichoscyphelloideae および Hyaloscyphoideae を設け, 前者には *Lachnellula* のみを含めた. 本研究の結果から, *Lachnellula* は *Lachnum* と近縁であることが明らかになり, ヒアロスキファ科に置くのが妥当であると考えられる.

また, クレード6には *Lachnum pulverulentum* が含まれた. *L. pulverulentum* は, 無柄もしくはほぼ無柄の黄色の子嚢盤を形成し, 糸状の側糸と, 褐色の樹脂状物が付着する, 無色で表面全体が粗い顆粒に覆われた毛を有し, 針葉樹を基質とする菌類である. 上記のような特徴は, *Lachnellula* に該当するものであるが, 子嚢盤が小型であるためこれまでの分類では *Lachnellula* に含められることはなかった. しかし, 本研究の結果に照らして, *L. pulverulentum* は, *Lachnum* から *Lachnellula* に新組み合わせとして移籍させるべきである.

5) *Albotricha* (クレード7)

クレード7は, *Albotricha acutipila*, *A. albotestacea*, *Albotricha* sp. 1 からなる単系統群であり, 本研究で構築した分子系統樹のうち, 6つにおいてBP値80%以上で支持された. *A. albotestacea* は草本の茎を基質とし, 他方 *A. acutipila* および *Albotricha* sp. 1 は, ササの茎を基質とする. *A. acutipila*, *A. albotestacea* は, 先端が平滑かつ先鋭な粗い顆粒に覆われた無色の毛を有し, *Albotricha* sp. 1 は, 先端が先鋭もしくは先鋭かつかぎ状に湾曲し, 先端は平滑であり, 基部から中部にかけて顆粒に覆われた毛を有する. また, *A. acutipila* および *A. albotestaceae* は単細胞もしくは時に2細胞でやや長い紡錘形の子嚢胞子を形成し, *Albotricha* sp. 1 は二細胞で紡錘形の子嚢胞子を形成する. クレード7に含まれる3種は, 子嚢盤に短い柄を有することや, 先端が平滑な毛を有すること, 紡錘形の子嚢胞子を形成することが共通している.

Albotricha は, Dennis (1949) によって *Lachnum* の *Acutipilae* 節として扱われていた. しかし, Raitviir (1970) が, 先端に向かって細くなる毛をもち, 毛の表面が先端を除き粗い顆粒に覆われている種を *Albotricha* に含め *Lachnum* から独立させた. Cantrell & Hanlin (1997) は, *Albotricha* は扱っていなかったため, *Albotricha* と *Lachnum* の系統関係は明らかになっていなかった. クレード7が検出されたことより, *Albotricha* が狭義の *Lachnum* (クレード3) とは系統的に区別でき, 単系統群であることが示された.

6) *Dasyscyphella*

本研究のいずれの系統樹においても, *Dasyscyphella*

は単系統群を形成せず, 系統樹上での位置も定まらなかった (Fig. 2). 先端が平滑である毛を持つ菌類としては, *Albotricha* も存在するが, *Dasyscyphella* の毛の先端が円筒形からやや膨張するのに対して, *Albotricha* の毛はより繊細で先端に向かって細くなるのが特徴である. Weber (1992) は, *Dasyscyphella* と *Albotricha* は同様の毛の構造を持つと考え, *A. acutipila* を *Dasyscyphella* に移している. しかし, Leenurm *et al.* (2000) は, TEM を用いて *Albotricha* および *Dasyscyphella* の毛および子嚢小孔の形態を観察し, 2属の毛の構造が異なることを示している. 本研究で構築した分子系統樹においても, *Dasyscyphella* は *Albotricha* の単系統群には含まれず, *Albotricha* と *Dasyscyphella* は区別できることが示された. しかし, *Dasyscyphella* が自然な分類群でない可能性も示唆され, 本研究で解析に用いたのは3種のみであるため, さらにサンプル数を増やして, 解析する必要がある.

各遺伝子の系統分類学的解析における有用性について本研究で分子系統解析に用いた遺伝子の節約法情報サイトの数はRPB2遺伝子が最も多かった (Table 2). D1/D2領域は, 情報をもつサイトが最も少なく, 同種のサンプルでは変異は認められないか, もしくは数塩基のみであった. D1/D2領域は, 本研究で用いた他の遺伝子領域に比べ, 進化速度が遅く保守的な領域であると考えられる.

また, 各遺伝子の系統樹におけるBP値80%で支持される枝の数を比較してみると, RPB2の系統樹においてBP値80%以上で支持される枝の数が最も多かった (Table 3).

ビョウタケ目に近縁とされるLecanoromycetesの分子系統学的研究においても, RPB2の有用性が示されているが (Hofstetter *et al.*, 2007), 本研究の結果においてもrRNA遺伝子をコードする領域に比べ, RPB2が有用であることが示唆された. また, 本研究ではD1/D2とRPB2のデータを連結して解析に用いたが, このデータセットを用いた系統樹においては, BP値80%以上で支持される枝の数は, 各遺伝子を単独で用いた場合よりも多かった. *Lachnum* とその類縁菌類の分子系統解析においても, RPB2は有用性を示し, RPB2とrRNA遺伝子塩基配列を連結することにより, さらに分子系統解析における有用性が増すことが示唆された.

Lachnum およびその類縁菌類の分類学的な範囲 *Trichopezizella*, *Trichopeziza*, *Lasiobelonium* を除くラクヌム型菌類が単系統群を形成することが示された

(Fig. 2). *Trichopezizella*, *Trichopeziza*, *Lasiobelonium* は、いずれも、表面全体が平滑な毛と多角～円形菌組織の托を有するのが共通で、毛の表面の少なくとも一部が顆粒に覆われている *Lachnum*, *Brunnipila*, *Incrucipulum*, *Dasyscyphella*, *Lachnellula*, *Albotricha* と異なっている。Raitviir (2002) は、上述のすべてのラクヌム型菌類の属を含む科として、ラクヌム科 Lachnaceae を提唱したが、本研究の結果は、平滑・粗面両方の毛を含む菌群の単系統性は示唆されなかった。したがってラクヌム型菌類の中で、自然な分類群を見いだすためには、*Trichopeziza*, *Trichopezizella*, *Lasiobelonium* を除く、少なくとも毛の基部の表面が顆粒に覆われ、槍形もしくは幅の狭い槍形の側糸を有するラクヌム型菌類がグループとして定義されるべきであることが示唆された。しかし、これらに対し、ラクヌム科を提唱するには、さらに多くの周辺分類群を含めての系統解析が必要となる。

要 約

日本産 *Lachnum* (ヒアロスキファ科, ビョウタケ目) とその類縁分類群の系統関係の解明および系統に基づく分類体系の再検討を目的とし、*Lachnum* と類縁分類群 7 属 37 種 58 菌株の複数遺伝子 (ITS-5.8S, 28S rRNA D1/D2 領域, RPB2 および β -ubulin) 塩基配列をもとに系統解析を行った。もっとも有益な分子情報であった D1/D2, RPB2 塩基配列データを連結した系統樹において 7 つのクレードの単系統性が統計的に高く支持され、これらのクレードは他の分子系統樹でも同様のことがみとめられた。4 つのクレードから、*Incrucipulum*, *Brunnipila*, *Lachnellula*, *Albotricha* の単系統性が示され、*Lachnum* に分類されていた *L. radiatum* と *L. longispineum* は *Incrucipulum* に *L. pulverulentum* は *Lachnellula* に移籍すべきである。*Lachnum* 属分類群は 3 つの単系統群に分かれ、属の多系統性が示された。表面が平滑な毛をもつ属以外の、少なくとも毛の基部の表面が顆粒に覆われる種が単系統性を示した。

本研究助成で得られた研究成果の報告

【口頭発表】

- 1) 篠川麗, 細矢剛, 柿嶋真, 外山香子, 山口薫 (2006) 日本産 *Lachnum* 属菌類とその近縁種 (ヒアロスキファ科) の分子系統学的研究. 日本菌学会第50回大会 (千葉) (2006年 6 月 3-4 日).
- 2) 篠川麗・細矢剛・柿嶋真 (2007) *Lachnum* 属菌類 (子囊菌亜門, Lachnaceae) とその近縁種の分子系統学的

研究. 日本菌学会第51回大会 (つくば) (2007年 5 月 26-27 日)

- 3) 篠川麗, 細矢剛, 柿嶋真, 外山香子, 山口薫 (2008) *Lachnum* 属とその類縁菌類の分子系統学的研究. 日本菌学会第52回大会 (三重) (2008年 5 月 31 日～ 6 月 1 日).

保存機関に寄託した菌株

本研究において分離され、同定された分離株の一部については NBRC に寄託しており、利用可能である。

Albotricha acutipila NBRC 104372
Albotricha acutipila NBRC 104380
Albotricha albotestacea NBRC 101346
Albotricha albotestacea NBRC 104379
Albotricha sp. NBRC 104363
Albotricha sp. NBRC 104384
Arachnopeziza aurata NBRC 102331
Arachnopeziza aurelia NBRC 102330
Arachnopeziza delicatula NBRC 102329
Arachnopeziza obtusipila NBRC 102333
Arachnopeziza obtusipila NBRC 102334
Arachnopeziza sp. NBRC 102327
Arachnopeziza sp. NBRC 102328
Dasyscyphella longistipitata NBRC 101335
Dasyscyphella longistipitata NBRC 101336
Dasyscyphella longistipitata NBRC 101351
Dasyscyphella montana NBRC 101338
Dasyscyphella montana NBRC 102336
Dasyscyphella sp. NBRC 104367
Hyaloscypha sp. NBRC 101356
Hymenoscyphus varicosporoides NBRC 104355
Lachnellula occidentalis NBRC 101339
Lachnellula occidentalis NBRC 101342
Lachnellula resinaria NBRC 102346
Lachnellula subtilissima NBRC 104388
Lachnellula suecica NBRC 101348
Lachnum abnorme NBRC 101350
Lachnum abnorme NBRC 104360
Lachnum abnorme NBRC 104362
Lachnum asiaticum NBRC 101341
Lachnum ciliare NBRC 102344
Lachnum ciliare NBRC 102345
Lachnum fuscescens NBRC 104364
Lachnum fuscescens NBRC 104365
Lachnum longispineum NBRC 102347
Lachnum nudipes NBRC 104369
Lachnum nudipes NBRC 104370

Lachnum pudibundum NBRC 102335
Lachnum pudibundum NBRC 102338
Lachnum pudibundum NBRC 104356
Lachnum pulverulentum NBRC 101337
Lachnum radiatum NBRC 101355
Lachnum radiatum NBRC 102343
Lachnum radiatum NBRC 104385
Lachnum rhytismatis NBRC 101345
Lachnum rhytismatis NBRC 101354
Lachnum soppittii NBRC 101340
Lachnum soppittii NBRC 104357
Lachnum soppittii NBRC 104361
Lachnum sp. NBRC 101344
Lachnum sp. NBRC 101352
Lachnum sp. NBRC 102337
Lachnum sp. NBRC 102339
Lachnum sp. NBRC 104366
Lachnum sp. NBRC 104368
Lachnum sp. NBRC 104371
Lachnum sp. NBRC 104373
Lachnum sp. NBRC 104374
Lachnum sp. NBRC 104375
Lachnum sp. NBRC 104376
Lachnum sp. NBRC 104378
Lachnum sp. NBRC 104381
Lachnum sp. NBRC 104382
Lachnum sp. NBRC 104389
Lachnum sp. NBRC 104390
Lachnum varians NBRC 102332
Lachnum virgineum NBRC 101343
Lachnum virgineum NBRC 101347
Lachnum virgineum NBRC 101349
Lachnum virgineum NBRC 104358
Lachnum virgineum NBRC 104359
Lasiobelonium lonicerae NBRC 102341
Polydesmia pruinosa NBRC 102369
Trichopeziza mollissima NBRC 102340
Trichopeziza mollissima NBRC 102342
Trichopeziza mollissima NBRC 104386
Trichopezizella otanii NBRC 101353
Trichopezizella otanii NBRC 104387
Trichopezizella sp. NBRC 104377
Trichopezizella sp. NBRC 104383

謝 辞

本研究は（財）発酵研究所研究助成（2005年4月～

2008年3月）によって行われたものです。本テーマを選定し、貴重な研究助成を頂戴しました（財）発酵研究所の皆様には感謝します。本研究を実施するにあたり、重要なデータ取得、分子系統解析などを精力的にこなして下さいました筑波大学生命環境科学研究科、篠川麗氏に深く御礼申し上げます。採集の便宜を供与して下さいました筑波大学大学院生命環境科学研究科、徳増征二教授に厚く御礼申し上げます。そして、一部のサンプルについて、28S rRNA 遺伝子塩基配列データを提供して下さった、独立行政法人製品評価技術基盤機構、中桐 昭博士、外山香子氏、山口 薫氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Baral, H. O. & Krieglsteiner, G. J. (1985) Bausteine zu einer Askomyzeten-Flora der Bundesrepublik Deutschland: in Süddeutschland gefundene inoperculate Diskomyceten mit taxonomischen, ökologischen und chorologischen Hinweisen. Beih. Z. Mykol. **6**: 1-226.
- Cantrell, S. A. & Hanlin, R. T. (1997) Phylogenetic relationships in the family Hyaloscyphaceae inferred from sequences of ITS regions, 5.8S ribosomal DNA and morphological characters. Mycologia **89**: 745-755.
- Dennis, R. W. G. (1949) A revision of the British Hyaloscyphaceae, with notes on related European species. Mycol. Pap. **32**: 1-97.
- Dennis, R. W. G. (1962) A reassessment of *Belonidium* Mont. et Duriew. Persoonia **2**: 171-191.
- Dharne, C. G. (1965) Taxonomic investigation on the discomycetes genus *Lachnellula* Karst. Phytopath. Zeitschr. **53**: 101-144.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. & Bult, C. (1995) Constructing a significance test for incongruence. Syst. Biol. **44**: 570-572.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. **2**: 113-118.
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1323-1330.
- Hansen, K., LoBuglio, K. F. & Pfister, D. H. (2005) Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and Pezizaceae inferred from multiple nuclear genes: RPB2, β -tubulin, and LSU rDNA. Mol. Phylogenet. Evol. **36**: 1-23.
- Hofstetter, V., Miadlikowska, J., Kauff, F. & Lutzoni, F. (2007) Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). Mol. Phylogenet. Evol. **44**: 412-426.

細矢剛（1997）日本産盤菌類，特にヒアロスキファ科菌類の収集と有用生理活性物質の探索研究．日菌報．**38**: 261-

- 266.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001) Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi. 9th ed., p.268 CAB International.
- Korf, R. P. (1973) Discomycetes and Tuberales. In Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., & Sussman, S. A. (eds.), *The Fungi: An advanced treatise* Vol. 4A, p. 249-319, Academic Press, New York.
- Leenurm, K., Raitviir, A. & Raid, R. (2000) Studies on the ultrastructure of *Lachnum* and related genera (Hyaloscyphaceae, Helotiales, Ascomycetes). *Sydowia* **52**: 30-45.
- Liu, Y. J., Whelen, S. & Hall, B. D. (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1799-1808.
- Liu, Y. J. & Hall, B. D. (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**: 4507-4512.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T. Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.-H., Lücking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R. C., Hosaka, K., Lim, Y.-W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R., & Vilgalys, R. (2004) Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* **91**: 1446-1480.
- 三好孝典, 小野泰典, 清水伸一 (2007) 愛媛県におけるカンキツ幹腐病の発生と PCR による本病原菌の検出. *日植病報* **73**: 9-14.
- Nannfeldt, J. A. (1932) Studien über Morphologie und Systematik der nichtlichenisierten inoperculaten Discomyceten. *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.* **8**: 1-368 +20 Figs.
- O'Donnell, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In Reynolds, D. R. & Taylor J. W. (eds.), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*, p.225-233, CAB International, Wallingford, UK.
- Otani, Y. (1967) Notes on some cup fungi of the Hyaloscyphaceae collected in Hokkaido, Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **8**: 33-42.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Raitviir, A. G. (1970) Synopsis of the Hyaloscyphaceae. *Scripta Mycol.* **1**: 1-115.
- Raitviir, A. G. (1987a) System of hyaloscyphic fungi. *Mikol. Fitopatol.* **21**: 200-206.
- Raitviir, A. G. (1987b) Notes on the taxonomy and nomenclature of *Belonidium*, *Trichopeziza* and *Lachnum* (Hyaloschyphaceae) in the light of the homologous series concept. *Proceedings of the science of the Estonian SSR, Biology*, p. 313-318.
- Raitviir, A. G. (2002) A revision of the genus *Dasyscyphella* (Hyaloscyphaceae, Helotiales). *Polish Bot. J.* **47**: 227-241.
- 貞野光弘, 細矢剛, 川田洋一, 大和浩国. (1998) *Lachnum abnorme* によるユズ幹腐病 (新称). *日植病報* **64**: 437
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Skerman, V. B. D. (1968) A new type of micromanipulator and microforge. *J. Gen. Microbiol.* **54**: 287-297.
- Spatafora, J. W., Sung, G.-H., Johnson, D., Hesse, C., O'Rourke, B., Serdani, M., Spotts, R., Lutzoni, F., Hofstetter, V., Miadlikowska, J., Reeb, V., Gueidan, C., Fraker, E., Lumbsch, T., Lücking, R., Schmitt, I., Hosaka, K., Aptroot, A., Roux, C., Miller, A. N., Geiser, D. M., Hafellner, J., Hestmark, G., Arnold, A. E., Budel, B., Rauhut, A., Hewitt, D., Untereiner, W. A., Cole, M. S., Scheidegger, C., Schultz, M., Sipman, H. & Schoch, C. L. (2006) A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* **98**: 1018-1028.
- Spooner, B. M. (1987) Helotiales of Australasia: Geoglossaceae, Orbiliaceae, Sclerotiniaceae, Hyaloscyphaceae. *Bibl. Mycol.* **116**: 1-711.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods.) Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tanaka, I. & Hosoya, T. (2001) Hyaloscyphaceae in Japan (4): New records of the genus *Lachnum*. *Mycoscience* **42**: 597-609.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- 椿 啓介 (1978) Skerman 式ミクロマニプレーターとマイクロフォーの紹介. *日菌報* **19**: 237-239.
- Wang, Z., Binder, M., Schoch, C. L., Johnston, P. R., Spatafora, J. W. & Hibbett, D. S. (2006) Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* **41**: 295-312.
- Weber, E. (1992) Untersuchungen zu Fortpflanzung und Ploidie verschiedener Ascomyceten. *Bibl. Mycol.* **140**: 1-186.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, p.315-322, Academic Press, San Diego.
- Yu, Z. H. & Zhuang, W. Y. (2003) Phylogenetic relationships of *Lachnum* and related genera inferred from partial sequence of 18S rDNA. *Mycosystema* **22**: 42-49 (in Chinese).

地衣類を構成する地衣菌および共生藻の分離培養保存と系統分類

山 本 好 和

秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科
〒010-0195 秋田県秋田市下新城野字街道端西241-438

Isolation, preservation and systematics of mycobionts and photobionts that compose lichens

Yoshikazu Yamamoto

Department of Bioproduction Sciences, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University
241-438, Kaidobata-nishi, Shimoshinjo-nakano, Akita, Akita 010-0195, Japan

About 2000 lichen specimens have been collected from Japan, Korea and Malaysia for these 3 years. Distributions of selected 12 species were clarified in Japan. Until now, 309 species of mycobionts were isolated by the culture methods using spores and thallus tissues among about 1600 known species of Japanese lichens and also photobionts were isolated by the tissue culture method. It was attempted to freeze cultured lichen mycobionts in the liquid nitrogen; most of mycobionts could be survived after the stepwise freezing. Though three morphologically resembled pairs of lichens were chemically distinguished by the color test until now, it was difficult to do them by the PDA-HPLC analyses. *Canoparmelia aptata* was proved to be phylogenetically identical with *C. texana*. We clarified the haplotypes of the mycobiont and photobiont of *Flavoparmelia caperata*.

Key words: Lichens, Fungal and algal culture of lichens, Systematics

緒 言

地衣類は菌類と藻類からなる共生生物である。菌類は地衣菌と呼ばれ、カビやキノコと同じ仲間である。一方の藻類は共生藻と呼ばれ、緑藻類、黄藻類、シアノバクテリア（ラン藻類）である（吉村, 1974; 山本, 2007）。地衣類はこのような共生関係を利用して熱帯の葉上から高山の岩上、（海）水圏から砂漠、深山幽谷の清浄な環境から都市街区の大気汚染の深刻な環境、酸性から塩基性に至る極限環境にまで生育している。このように生物界の中では特殊な位置を占める地衣類は、500種類以上の地衣成分と呼ばれる地衣類特有の化合物群を代謝産物として含有する。地衣成分の化学構造の解明は、1920年代から朝比奈および柴田（Asahina & Shibata, 1954）によって始まり、現在まで

に500種類以上の地衣成分が構造決定されている（Huneck & Yoshimura, 1996）。これら地衣成分は一般には構成する菌類の代謝産物と考えられている。地衣成分の地衣体における役割は明らかにされていないが、菌類と藻類の共生関係を保つための菌類の藻類に対する制御物質としての役割以外に、地衣類の増殖が他の微生物や植物に比べ遅いことから、微生物や植物に対する生長抑制物質（アエロパシー物質）として、また昆虫に対しては忌避物質としての役割を担っていると考えられている。また、極限環境に適応するために紫外線保護機能、保湿機能、耐乾・耐凍・耐寒機能を担うものと考えられている。そのため地衣類は古来、薬、飲料、食料、染料に応用されてきた（山本, 2001）。地衣成分の薬理活性については最近研究が進んでいる（Yamamoto *et al.*, 1998）。

現在では地衣類は菌類の一部と認識され、世界で約2万種が分布し、菌類の約1/4を占める。構成する菌類および藻類の分離培養は、胞子培養法（Yoshimura *et al.*, 2001）と組織培養法（Yamamoto *et al.*, 2001）が可能であるが、その適用範囲や条件は明らかではない。また、培養株の保存についても研究は少ない。系統分

E-mail: yyamamoto@akita-pu.ac.jp

共同研究者：小峰正史（秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科）、原光二郎（秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科）、高橋奏恵（秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科）

類については、近年遺伝子を用いた系統学的研究が進められているが、従来法である化学分類学的研究との関連が明らかにされた例は多くない。我々はこれら課題について進めた研究成果を報告する。

実験方法

材料 材料として国内および海外から採集した地衣標本を冷凍保存し胞子培養法および組織培養法に用いた。また、化学的あるいは分子的な系統分類検討に用いた。保存法の検討には、当研究室に保存している地衣菌株から選んで用いた。

方法 培養方法については、胞子培養法 (Yoshimura *et al.*, 2001) と組織培養法 (Yamamoto *et al.*, 2001) を用いた。詳細は引用文献に記載した方法を準用した。

保存方法については凍結保存法を採用した。凍結保存は液体窒素気相中 (-165℃) で半年間行い、「予備凍結なし」と「予備凍結あり」の2試験区を用いて試験した。各地衣菌培養株から50mgを秤量し「予備凍結なし」の試験区はそのまま凍結保存試験を行った。「予備凍結あり」の試験区は、4℃ (冷蔵庫) で3日間予備凍結、次いで-83℃ (冷凍庫) で3日間放置した後に、凍結保存試験を行った。終了後50℃で1分半、温浴解凍を行い、その後、地衣菌重量を測定した後、麦芽酵母エキス (MY) 培地で90日間増殖試験をし、最終重量から初期重量を引いた増殖量が100mgを超えている種を凍結保存性があると判定した。

系統分類は、形態観察と化学成分分析、分子系統解析により行った。形態観察には通常を目視ならびに実体顕微鏡を用い、化学成分分析には、呈色反応とフォトダイオードアレイ付高速液体クロマトグラフィーを用いた。呈色反応は以下のようにして行った。(1) 地衣体の皮層をメスでかき取り、髄層を裸出させる。(2) 呈色液としてP液 (パラフェニレンジアミンのエタノール溶液) またはK液 (1N水酸化ナトリウム溶液)、C液 (アンチホルミン液) を用意する。(3) 各液に細筆を浸した後、髄層に当てて色の変化を見る。フォトダイオードアレイ付高速液体クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。装置：島津製作所製 HPLC 10A-DP, カラム：YMC-Pack ODS-A, 150 x 4.6 mm I. D., S-5μm, 12 nm, 流出溶媒：MeOH:H₂O:H₃PO₃ = 80:20:1, 流量：1 ml/min, カラム温度：40℃, 検出器：フォトダイオードアレイ, 検出波長：180-700 nm (254 nm)。分子系統解析は、DNAの抽出、rDNAのITS (ITS1+5.8S+ITS2) 領域の増幅、塩基配列の決定の

後に、Clustal W プログラムによりアライメントを作成し、NJplot プログラムを用いて系統樹を作成した。ハプロタイプ解析は、得られたアライメントをTCSプログラムにより解析後、Cytoscape プログラムを用いてハプロタイプネットワークを作成した。

結 果

地衣菌および共生藻の分離培養 日本産の地衣類で現在までに胞子培養 (**で示す) および組織培養 (*で示す) により127属309種の培養株を得た。培養に成功した種をTable 1に示した。分類体系は吉村ら (2006) に従った。数字は培養に成功した種数を示す。また、組織培養法により、地衣共生藻である *Trebouxia* spp. と *Nostoc* spp., *Myrmecia* sp., *Coccomyxa* sp. の分離に成功した。

地衣菌株の培養保存 地衣菌36属45種43株の凍結保存試験を行った。その結果をFig. 1に示す。-165℃の凍結保存において、予備凍結しなければ約56%の生存率であったものが、予備凍結を行うことで93%の地衣菌株が生存することが明らかになった。

地衣類の国内分布 助成期間内に国内各地 (北海道宗谷地方・道東地域, 秋田県八幡平・田沢湖・鳥海山・乳頭温泉, 岩手県御所湖, 群馬県赤城山, 東京都高尾山, 長野県入笠山, 愛知県海上の森・香嵐溪・伊勢神峠, 滋賀県比叡山, 大阪府交野市・妙見山, 奈良県大台ヶ原山・奈良公園, 和歌山県高野山, 愛媛県石鎚山, 福岡県福岡市, 熊本県熊本市, 沖縄県山原など) および国外 (韓国済州島, タイ, マレーシア) で約2000点を採集し冷凍保存した。これら材料を培養実験, 化学分類実験, 分類系統実験に供した。

国内ではキウメノキゴケなど国内に広く分布し、分類同定が容易である12種について分布調査を行い、過去記録データと比較した。調査対象種としたものを以下の通りである。コフキザリナリア *Dirinaria appplanata*, ヨコワサルオガセ *Usnea diffracta*, アカサルオガセ *Usnea rubrotincta*, キウメノキゴケ *Flavoparmelia caperata*, ウメノキゴケ *Parmotrema tinctorum*, センシゴケ *Menegazzia terebrata*, イワニクイボゴケ *Ochrolechia parellula*, イワタケ *Umbilicaria esculenta*, ハナゴケ *Cladonia rangiferina*, トゲシバリ *Cladia aggregata*, ヘリトリゴケ *Porpidia albocaerulescens*, ニセキンブチゴケ *Pseudocyphellaria crocata*。Fig. 2にキウメノキゴケの国内分布を示した。コフキザリナリアはそれまでザバリカート酸を主成分

Table 1 Tissue cultures* from thalli and mycobionts from spores** of Japanese lichen species.

ORDER or Family		Genus	Species
Acarosporaceae	1	<i>Acarospora</i>	<i>A. fuscata</i> *
	0	<i>Phacopsis</i> , <i>Polysporina</i> , <i>Stragospora</i>	
AGYRIALES	0		
Arthoniaceae	2	<i>Arthonia</i>	<i>A. cinnabarina</i> ***, <i>A. spadicea</i> **
	0	<i>Eremothecella</i>	
Arthopyreniaceae	0	<i>Arthopyrenia</i> , <i>Mycomicrothelia</i>	
Arthrorhaphidaceae	0	<i>Arthrorhaphis</i>	
Asterothyriaceae	0	<i>Aterothyrium</i>	
Atheliaceae	0	<i>Dictyonema</i>	
Melaspilaceae	0	<i>Melaspilea</i>	
Baeomycetaceae	2	<i>Baeomyces</i>	<i>B. placophyllus</i> */**, <i>B. rufus</i> **
Bacidiaceae	2	<i>Tephromela</i>	<i>T. americana</i> **, <i>T. atra</i> *
	0	<i>Adelolechia</i> , <i>Bacidia</i> , <i>Bacidina</i> , <i>Cliostomum</i> , <i>Japewia</i> , <i>Lecania</i> , <i>Phyllospora</i> , <i>Solenospora</i> , <i>Triclinum</i> , <i>Malocolmiella</i>	
Biatorrellaceae	0	<i>Biatorrella</i>	
Brigantiaceae	1	<i>Brigantiaea</i>	<i>B. ferruginea</i> *
Caliciaceae	3	<i>Calicium</i>	<i>C. abietinum</i> *, <i>C. chlorosporum</i> *, <i>C. viride</i> *
	0	<i>Acroscyphus</i>	
Candelariaceae	0	<i>Candelaria</i> , <i>Candelariella</i>	
Catillariaceae	0	<i>Catillaria</i> , <i>Toninia</i>	
Chrysothrichaceae	1	<i>Chrysothrix</i>	<i>C. candelaris</i> *
	1	<i>Cladia</i>	<i>C. aggregata</i> *
Cladoniaceae	37	<i>Cladonia</i>	<i>C. amaurocraea</i> *, <i>C. arbuscula</i> subsp. <i>beringiana</i> *, <i>C. arbuscula</i> subsp. <i>mitis</i> *, <i>C. bellidiflora</i> *, <i>C. borealis</i> *, <i>C. cenotea</i> *, <i>C. cervicornis</i> *, <i>C. chlorophaea</i> *, <i>C. coccifera</i> *, <i>C. cornuta</i> *, <i>C. crispata</i> *, <i>C. cryptochlorophaea</i> , <i>C. cyanipes</i> *, <i>C. deformis</i> *, <i>C. digitata</i> *, <i>C. furcata</i> *, <i>C. graciliformis</i> *, <i>C. gracilis</i> subsp. <i>turbinate</i> *, <i>C. granulans</i> **, <i>C. grayi</i> *, <i>C. humilis</i> *, <i>C. krempelhuberi</i> *, <i>C. macilenta</i> *, <i>C. maxima</i> *, <i>C. merochlorophaea</i> *, <i>C. metacorallifera</i> *, <i>C. phyllophora</i> *, <i>C. pleurota</i> */**, <i>C. ramulosa</i> **, <i>C. rangiferina</i> *, <i>C. rappii</i> *, <i>C. stellaris</i> *, <i>C. strepsilis</i> *, <i>C. subcariosa</i> **, <i>C. turgida</i> *, <i>C. uncialis</i> *, <i>C. vulcani</i> */**
	1	<i>Gymnoderma</i>	<i>G. coccocarpum</i> *
	1	<i>Pilophorus</i>	<i>P. clavatus</i> ***
	0	<i>Thysanothecium</i>	
Clavariaceae	0	<i>Multiclavula</i>	
Coccocarpiaceae	0	<i>Coccocarpia</i> , <i>Spilonema</i> , <i>Spilonemella</i>	
Coccotremataceae	1	<i>Coccotrema</i>	<i>C. porinopsis</i> *
Collemataceae	0	<i>Collema</i> , <i>Leptogium</i> , <i>Physma</i> , <i>Ramalodium</i> , <i>Massalongina</i>	
Coniocybaceae	2	<i>Chaenotheca</i>	<i>C. brunneola</i> *, <i>C. furfuracea</i> */**
	0	<i>Cyphelium</i> , <i>Sclerophora</i>	
Crocyniaceae	0	<i>Crocynia</i>	
Ectolechiaceae	0	<i>Badimia</i> , <i>Barubria</i> , <i>Calopadia</i> , <i>Lasioloma</i> , <i>Loflammia</i> , <i>Lopadium</i> , <i>Sporopodium</i> , <i>Trapellaria</i>	
Fuscideaceae	0	<i>Fuscidea</i> , <i>Maronea</i> , <i>Orphinospora</i> , <i>Ropalospora</i>	
Graphidaceae	1	<i>Diorygma</i>	<i>D. soozana</i> *
	1	<i>Glyphis</i>	<i>G. cicatricosa</i> *
	9	<i>Graphis</i>	<i>G. awaensis</i> *, <i>G. cervina</i> */**, <i>G. cognata</i> *, <i>G. connectans</i> */**, <i>G. intricata</i> *, <i>G. proserpens</i> *, <i>G. rikuzensis</i> *, <i>G. scripta</i> */**, <i>G. tenella</i> */**
	1	<i>Leiorreuma</i>	<i>L. exaltatum</i> */**
	2	<i>Phaeographis</i>	<i>P. asteriformis</i> */**, <i>P. pruinosa</i> **
	1	<i>Sarcographa</i>	<i>S. melanocarpa</i> *
	0	<i>Carbacanthographis</i> , <i>Fissurina</i> , <i>Gyrostomum</i> , <i>Hemithecium</i> , <i>Platygramma</i> , <i>Platythecium</i> , <i>Thecaria</i>	
GYALECTALES	0		
Gomphilaceae	0	<i>Echinoplaca</i> , <i>Gyalecidium</i> , <i>Gyalideopsis</i> , <i>Sagiolechia</i> , <i>Tricharia</i>	
Haematommataceae	1	<i>Haematomma</i>	<i>H. puniceum</i> ***
Hymeneliaceae	1	<i>Aspicilia</i>	<i>A. contorta</i> **
	1	<i>Tremolecia</i>	<i>T. atrata</i> *
	0	<i>Lobothallia</i>	
Icmadophilaceae	2	<i>Dibaeis</i>	<i>D. absoluta</i> **, <i>D. baeomyces</i> *
	2	<i>Icmadophila</i>	<i>I. ericetorum</i> *, <i>I. japonicum</i> *
	0	<i>Pseudobaeomyces</i> , <i>Siphula</i>	
Lecanoraceae	12	<i>Lecanora</i>	<i>L. argopholis</i> *, <i>L. chionocarpa</i> *, <i>L. cinereofusca</i> *, <i>L. imshaugii</i> *, <i>L. iseana</i> **, <i>L. megalocheila</i> */**, <i>L. muralis</i> **, <i>L. nipponica</i> */**

ORDER or Family	Genus	Species
		<i>L. pulicaris</i> **, <i>L. pulverulenta</i> **, <i>L. sibirica</i> */**, <i>L. subimmergens</i> **
	0	<i>Calvitimela</i> , <i>Carbonea</i> , <i>Clauzadeana</i> , <i>Lecidella</i> , <i>Miriquidica</i> , <i>Pyrrhospora</i> , <i>Scoliciosporum</i>
Lecideaceae	0	<i>Cecidonia</i> , <i>Hypocenomyces</i> , <i>Lecidea</i>
Leptosphaeriaceae	0	<i>Leptosphaeria</i> , <i>Tomaselia</i>
Letroitaceae	0	<i>Letroitia</i>
Lichinaceae	0	<i>Anema</i> , <i>Ephebe</i> , <i>Lichinella</i> , <i>Paulia</i> , <i>Phylliscum</i> , <i>Pyrenopsis</i> , <i>Synalissa</i> , <i>Thyrea</i>
Lobariaceae	1	<i>Lobaria</i> <i>L. adscripturiens</i> **
	1	<i>Pseudocyphellaria</i> <i>P. aurata</i> *
	0	<i>Sticta</i>
Loxosporaceae	1	<i>Loxospora</i> <i>L. ochrophaea</i> */**
Megalosporaceae	2	<i>Megalospora</i> <i>M. sulphurata</i> *, <i>M. tuberculosa</i> **
Melaspileaceae	0	<i>Melaspilea</i>
Micareaeae	1	<i>Psilolechia</i> <i>P. lucida</i> **
	0	<i>Helocarpon</i> , <i>Micarea</i> , <i>Melaspilea</i>
Microtheliopsidaceae	0	<i>Microtheliopsis</i>
Monoblatiaceae	0	<i>Acrocordia</i> , <i>Anisomeridium</i>
Mycoblastaceae	1	<i>Mycoblastus</i> <i>M. sanginarius</i> *
Mycocaliciaceae	0	<i>Chaenothecopsis</i> , <i>Mycocalicium</i> , <i>Phaeocalicium</i> , <i>Stenocybe</i>
Leptosphaeriaceae	0	<i>Leptosphaeria</i>
Nepromataceae	1	<i>Nephroma</i> <i>N. helveticum</i> **
Opegraphaceae	0	<i>Opegrapha</i>
Ophioparmaceae	1	<i>Ophioparm</i> <i>O. ventosa</i> */**
Pannariaceae	0	<i>Erioderma</i> , <i>Fuscopannaria</i> , <i>Kroswia</i> , <i>Leioderma</i> , <i>Pannaria</i> , <i>Parmeliella</i> , <i>Protopannaria</i> , <i>Psoroma</i> , <i>Santessoniella</i>
Parmeliaceae	4	<i>Alectoria</i> <i>A. lata</i> *, <i>A. nigricans</i> *, <i>A. ochroleuca</i> *
	3	<i>Anzia</i> <i>A. colpota</i> *, <i>A. japonica</i> *, <i>A. opuntiella</i> *
	2	<i>Arctoparmelia</i> <i>A. centrifuga</i> *, <i>A. separata</i> *
	2	<i>Asahinea</i> <i>A. chrysantha</i> *, <i>A. schoranderi</i> *
	2	<i>Bryoria</i> <i>B. furcellata</i> *, <i>B. trichodes</i> *
	1	<i>Bryocaulon</i> <i>B. divergens</i> *
	1	<i>Bulbothrix</i> <i>B. isidiza</i> *
	1	<i>Canomaculina</i> <i>C. subtinctoria</i> *
	4	<i>Cetraria</i> <i>C. aculeata</i> *, <i>C. laevigata</i> *, <i>C. islandica</i> subsp. <i>orientalis</i> *, <i>C. odontella</i> *
	1	<i>Cetrariella</i> <i>C. delisei</i> *
	4	<i>Cetrelia</i> <i>C. braunsiana</i> *, <i>C. chicitae</i> *, <i>C. japonica</i> *, <i>C. nuda</i> *
	1	<i>Cornicularia</i> <i>C. normoerica</i> *
	3	<i>Evernia</i> <i>E. divaricata</i> *, <i>E. esorediosa</i> *, <i>E. prunastri</i> *
	1	<i>Everniastrum</i> <i>E. cirrhatum</i> *
	2	<i>Flavocetraria</i> <i>F. cuculata</i> , <i>F. nivalis</i> *
	1	<i>Flavoparmelia</i> <i>F. caperata</i> *
	1	<i>Flavopunctelia</i> <i>F. sorediata</i> *
	9	<i>H. fragillima</i> *, <i>H. hypotrypella</i> *, <i>H. metaphysodes</i> *, <i>H. nikkoensis</i> *, <i>H. physodes</i> */**, <i>H. pseudoenteromorpha</i> *, <i>H. pseudophysodes</i> *, <i>H. submundata</i> *, <i>H. vittata</i> */**
	5	<i>Hypotrachyna</i> <i>H. koyaensis</i> *, <i>H. osseovalba</i> *, <i>H. pseudosinuosa</i> *, <i>H. revoluta</i> *, <i>H. sinuosa</i> *
	1	<i>Imshuagia</i> <i>I. aleurites</i> *
	1	<i>Karoowia</i> <i>K. saxeti</i> *
	2	<i>Melanelia</i> <i>M. olivacea</i> */**, <i>M. stygia</i> *
	1	<i>Menegazzia</i> <i>M. terebrata</i> *
	5	<i>Myelochroa</i> <i>M. aurulenta</i> *, <i>M. entotheiochroa</i> *, <i>M. galbina</i> *, <i>M. irrugans</i> *, <i>M. leucotylica</i> *
	4	<i>Nephromopsis</i> <i>N. asahinae</i> *, <i>N. endocrocea</i> *, <i>N. ornata</i> *, <i>N. pseudocomplicata</i> *
	12	<i>Parmelia</i> <i>P. adaugescens</i> *, <i>P. fertilis</i> *, <i>P. isidioclada</i> *, <i>P. laevior</i> */**, <i>P. marmorolypha</i> *, <i>P. omphalodes</i> **, <i>P. pseudolaevior</i> *, <i>P. pseudoshinanoana</i> *, <i>P. saxatilis</i> *, <i>P. shinanoana</i> *, <i>P. squarrosa</i> *, <i>P. sulcata</i> *
	1	<i>Parmelinella</i> <i>P. wallichiana</i> *
	3	<i>Parmelinopsis</i> <i>P. horrescens</i> *, <i>P. minarum</i> *, <i>P. spumosa</i> *
	1	<i>Parmeiopsis</i> <i>P. ambigua</i> *
	7	<i>Parmotrema</i> <i>P. austrosinense</i> *, <i>P. cristiferum</i> *, <i>P. mellissii</i> *, <i>P. chinense</i> *, <i>P. parahypotropum</i> *, <i>P. praesorediosum</i> *, <i>P. tinctorum</i> *
	2	<i>Platismatia</i> <i>P. interrupta</i> *
	1	<i>Pseudephebe</i> <i>P. pubescens</i> *
	2	<i>Punctelia</i> <i>P. borneri</i> *, <i>P. rudecta</i> *
	3	<i>Rimelia</i> <i>P. clavulifera</i> *, <i>R. hawaiiensis</i> *, <i>R. reticulata</i> *
	1	<i>Sulcaria</i> <i>S. sulcata</i> *

地衣類を構成する地衣菌および共生藻の分離培養保存と系統分類

ORDER or Family	Genus	Species
	2 <i>Tuckermannopsis</i>	<i>T. americana*</i> , <i>T. sepincola*</i>
	1 <i>Tuckneraria</i>	<i>T. togashii*</i>
	15 <i>Usnea</i>	<i>U. baylei*</i> , <i>U. bismolliuscula*</i> , <i>U. ceratina*</i> , <i>U. diffracta*</i> , <i>U. filipendula*</i> , <i>U. himalanaya*</i> , <i>U. longissima*</i> , <i>U. merrillii*</i> , <i>U. nidifica*</i> , <i>U. pangiana*</i> , <i>U. pectinata*</i> , <i>U. rubicunda*</i> , <i>U. rubrotincta***</i> , <i>U. subfloridana*</i> , <i>U. trichodeoides*</i>
	2 <i>Vulpicida</i>	<i>V. juniperinus*</i> , <i>V. pinastri*</i>
	3 <i>Xanthoparmelia</i>	<i>X. coreana*</i> , <i>X. orientalis*</i> , <i>X. tuberculiformis*</i>
	0 <i>Allocetraria</i> , <i>Canoparmelia</i> , <i>Lethariella</i> , <i>Oropogon</i> , <i>Parmelina</i> , <i>Protpparmelia</i> , <i>Relicina</i>	
Peltigeraceae	0 <i>Peltigera</i> , <i>Solorina</i>	
Peltulaceae	0 <i>Peltura</i>	
Pertusariaceae	4 <i>Ochrolechia</i>	<i>O. parellula***</i> , <i>O. trochophora***</i> , <i>O. upsaliensis*</i> , <i>O. yasudae***</i>
	6 <i>Pertusaria</i>	<i>P. astomoides*</i> , <i>P. commutata*</i> , <i>P. corallina*</i> , <i>P. flavicans*</i> , <i>P. laeviganda*</i> , <i>P. subobductans**</i>
	0 <i>Varicellaria</i>	
Physciaceae	2 <i>Anaptychia</i>	<i>A. isidiza*</i> , <i>A. palmulata*</i>
	1 <i>Buellia</i>	<i>B. stellulata**</i>
	9 <i>Heterodermia</i>	<i>H. diademata*</i> , <i>H. hypochraea*</i> , <i>H. hypoleuca**</i> , <i>H. japonica*</i> , <i>H. leucomelae*</i> , <i>H. microphylla*</i> , <i>H. obscurata*</i> , <i>H. pandurata*</i> , <i>H. pseudospeciosa*</i>
	3 <i>Phaeophyscia</i>	<i>P. endococcinodes*</i> , <i>P. limbata*</i> , <i>P. squarrosa**</i>
	1 <i>Physcia</i>	<i>P. aipolia**</i>
	1 <i>Physciella</i>	<i>P. denigrata**</i>
	2 <i>Pyxine</i>	<i>P. endochrysina***</i> , <i>P. limbulata**</i>
	0 <i>Amandinea</i> , <i>Baculifera</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Hafellia</i> , <i>Hyperphyscia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Sculptolumina</i>	
Pilocarpaceae	0 <i>Bapalmua</i> , <i>Byssolecania</i> , <i>Byssoloma</i> , <i>Fellhanera</i> , <i>Fellhaneropsis</i>	
Placynthiaceae	0 <i>Placynthium</i> , <i>Polychidium</i> , <i>Polychidium</i> , <i>Vestergrenopsis</i>	
Porpidiaceae	1 <i>Amygdalaria</i>	<i>A. panaeola***</i>
	2 <i>Porpidia</i>	<i>P. albocaerulescens***</i> , <i>P. macrocarpa**</i>
	0 <i>Immersaria</i> , <i>Mycobilinda</i> , <i>Paraporpidia</i>	
Psoraceae	1 <i>Psora</i>	<i>P. scalaris*</i>
	0 <i>Lecidoma</i> , <i>Protoblastenia</i> , <i>Psorula</i>	
Pyrenulaceae	1 <i>Pyrenula</i>	<i>P. japonica*</i>
	0 <i>Anthracotheicum</i> , <i>Distopyrenis</i> , <i>Lithothelium</i> , <i>Pyrgilius</i> , <i>Sulcopyrenula</i>	
Ramalinaceae	15 <i>Ramalina</i>	<i>R. almquistii*</i> , <i>R. conduplicans***</i> , <i>R. dilacerata***</i> , <i>R. duriei*</i> , <i>R. exilis*</i> , <i>R. geniculata*</i> , <i>R. leiodea*</i> , <i>R. litoralis*</i> , <i>R. pacifica*</i> , <i>R. pertusa*</i> , <i>R. peruviana*</i> , <i>R. roesleri***</i> , <i>R. siliquosa***</i> , <i>R. sinensis**</i> , <i>R. subbreviscula*</i> , <i>R. yasudae*</i>
Rhizocarpaceae	1 <i>Rhizocarpon</i>	<i>R. geographicum*</i>
	0 <i>Catolechia</i> , <i>Epilicheri</i>	
Roccellaceae	1 <i>Enterographa</i>	<i>E. praepallens*</i>
	0 <i>Bactrospora</i> , <i>Chiodecton</i> , <i>Cresponea</i> , <i>Dichosporidium</i> , <i>Lecanactis</i> , <i>Lecanographa</i> , <i>Mazosia</i> , <i>Opegrapha</i> , <i>Pulvinodecton</i> , <i>Roccellina</i> , <i>Schismatoma</i>	
Solorinellaceae	0 <i>Gyalidea</i>	
Sphaerophoraceae	2 <i>Bunodophoron</i>	<i>B. formosanum*</i> , <i>S. melanocarpum*</i>
	3 <i>Sphaerophorus</i>	<i>S. fragilis*</i> , <i>S. globosus*</i> , <i>S. meiophorus*</i>
Sphinctrinaceae	0 <i>Sphinctrina</i>	
Stereocaulaceae	11 <i>Stereocaulon</i>	<i>S. curtatum*</i> , <i>S. commixtum**</i> , <i>S. exutum*</i> , <i>S. intermedium*</i> , <i>S. japonicum***</i> , <i>S. octomerellum*</i> , <i>S. paschale*</i> , <i>S. sasakii**</i> , <i>S. soreidiiferum***</i> , <i>S. vesvianum***</i>
Stictidaceae	0 <i>Petractis</i>	
Strigulaceae	0 <i>Hyalopyrenia</i> , <i>Strigula</i>	
Teloschistaceae	5 <i>Caloplaca</i>	<i>C. crenularia**</i> , <i>C. flavorubescens**</i> , <i>C. leptopisma**</i> , <i>C. lobulata***</i> , <i>C. scopularis*</i>
	3 <i>Xanthoria</i>	<i>X. elegans*</i> , <i>X. fallax*</i> , <i>X. mandschurica*</i>
Thelotremataceae	3 <i>Thelotrema</i>	<i>T. lepadium**</i> , <i>T. nipponicum**</i> , <i>T. subtile***</i>
	0 <i>Chroodiscus</i> , <i>Diploschistes</i> , <i>Ingvariella</i> , <i>Myriotrema</i> , <i>Ocellularia</i>	
Thelenellaceae	0 <i>Thelenella</i> , <i>Julella</i>	
Tricholomataceae	0 <i>Lichenomphalia</i>	
Trichotheliaceae	0 <i>Porina</i> , <i>Trichothelium</i>	
Trypetheliaceae	1 <i>Trypethelium</i>	<i>T. eluteriae</i>
	0 <i>Pseudopyrenula</i> , <i>Trypetheliopsis</i>	
Umbilicariaceae	1 <i>Lasallia</i>	<i>L. pensylvanica*</i>
	8 <i>Umbilicaria</i>	<i>U. caroliniana*</i> , <i>U. cylindrica*</i> , <i>U. esculenta*</i> , <i>U. hyperborea*</i> , <i>U. kisovana*</i> , <i>U. muehlenbergii*</i> , <i>U. proboscidea*</i> , <i>U. vellea*</i>
Verrucariaceae	1 <i>Dermatocarpon</i>	<i>D. minutum*</i>
	1 <i>Normandina</i>	<i>N. pulchella*</i>

ORDER or Family	Genus	Species
Xanthopyreniaceae Imperfected	0	<i>Agonimia</i> , <i>Catapyrenium</i> , <i>Clavascidium</i> , <i>Neocatapyrenium</i> , <i>Placidium</i> , <i>Psoroglaena</i> , <i>Scleropyrenium</i> , <i>Staurothele</i> , <i>Thelidium</i> , <i>Verrucaria</i>
	0	<i>Collmopsidium</i>
	1	<i>Leprocaulon</i> <i>L. arbuscula</i>
	2	<i>Thamnolia</i> <i>T. subuliformis</i> , <i>T. vermicularis</i>
	0	<i>Lepraria</i> , <i>Botryolepraria</i>
Totals (46)	309	(127)

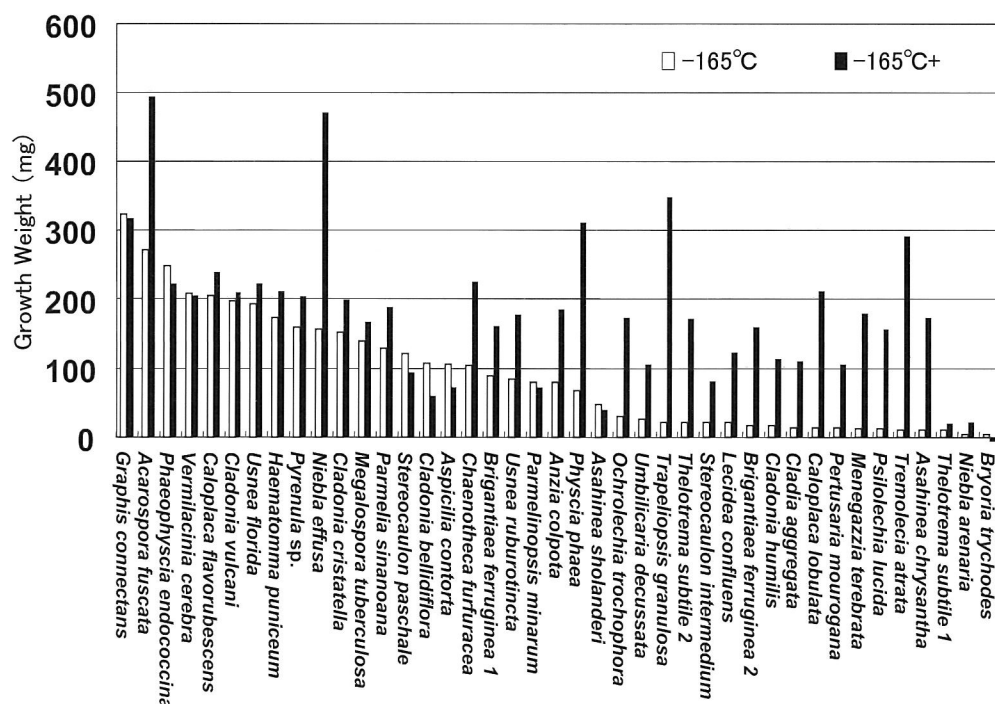


Fig. 1 Freezing preservation of cultured lichen mycobionts in the liquid nitrogen directly or after the stepwise freezing. Cultured lichen mycobionts were maintained at -165°C (□) for 6 months or they were done at -165°C after the stepwise freezing (■) for 6 months.

とするもののみが世界的に知られていたが、今回の調査で、セッカ酸を主成分とする化学変異型の存在が明らかになった。

地衣類の化学分類 国内各地で採集した形態的に類似しているトゲウメノキゴケ *Parmelinopsis minarum* とトゲウメノキゴケモドキ *P. horrescens* について先ず呈色反応で、次いで PDA-HPLC 分析での化学成分による同定を試みた。その結果、C 反応がー判定でトゲウメノキゴケモドキと同定した標本において、HPLC 分析により、微量また少量のジロホル酸の存在が確認できた。このことはそれら標本をトゲウメノキゴケモドキと同定したことは誤りであることを示している。

国内各地で採集した形態的に類似しているイオウゴケ *Cladonia vulcani* とコエダアカミゴケ *C. pseudomacilenta* について PDA-HPLC 分析での化学的

による同定を試みた。その結果、1 標本を除いて、タムノール酸を含むイオウゴケとスカマト酸を含むコエダアカミゴケに分類同定することができたが、1 標本（1 子柄）はタムノール酸とスカマト酸が共存していた。このことは、イオウゴケとコエダアカミゴケは化学的に分類ができないことを示している。イオウゴケとコエダアカミゴケと同様の結果が、シラチャウメノキゴケ *Canoparmelia aptata* とタナカウメノキゴケ *C. texana* でも得られた。すなわち、1 標本を除いて、ペルラトール酸を含むシラチャウメノキゴケとザバリカート酸を含むタナカウメノキゴケに分類同定することができたが、1 標本（1 子柄）はペルラトール酸とザバリカート酸が共存していた。Fig. 3 にはシラチャウメノキゴケとタナカウメノキゴケの HPLC を示す。

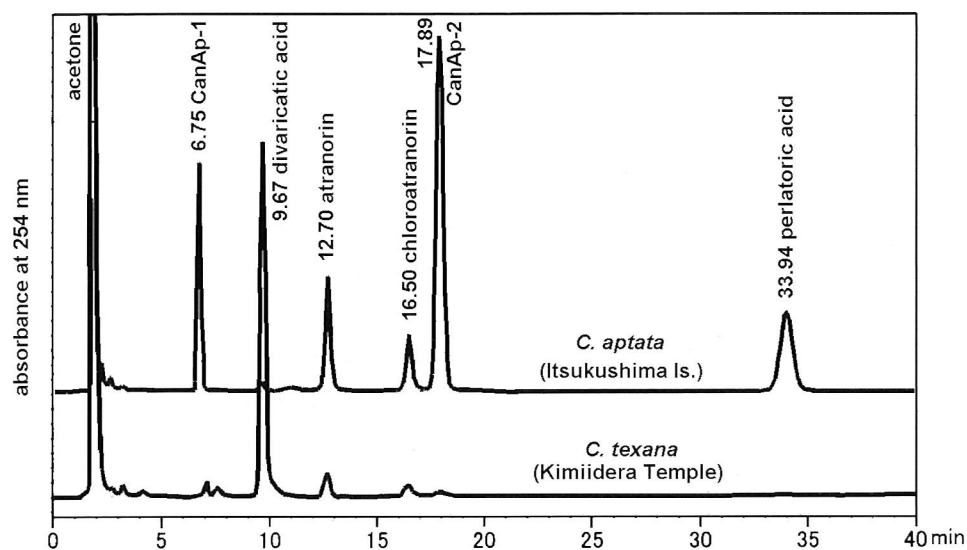


Fig. 2 HPLC chromatograms of acetone extracts of *Canoparmelia aptata* and *C. texana*. *Canoparmelia aptata* and *C. texana* were collected at Itsukushima Is., Hiroshima Pref. and Kimiidera temple, Wakayama Pref., respectively. HPLC conditions are as follows; column, YMC-Pack ODS-A, 150 x 4.6 mm I. D., S-5 μ m, 12 nm; solvent, MeOH:H₂O:H₃PO₃=80:20:1; flow rate, 1 ml/min; column temp., 40°C; detector, photodiode array.



Fig. 3 Distribution of *Flavoparmelia caperata* in Japan. Collection sites of our specimens of *F. caperata* collected from 2001 to 2007 are shown as large circles.

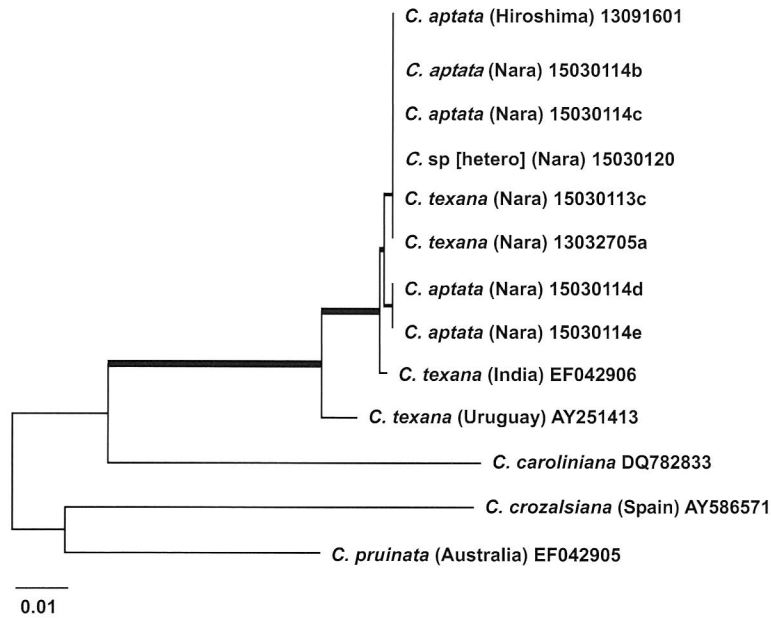


Fig. 4 Phylogenetic tree of *Canoparmelia aptata* and *C. texana*. Regions of ITS (ITS1+5.8 s +ITS2) of the specimens of *C. aptata* and *C. texana* collected in Japan were compared with the registered data in NCBI of other *Canoparmelia* species.

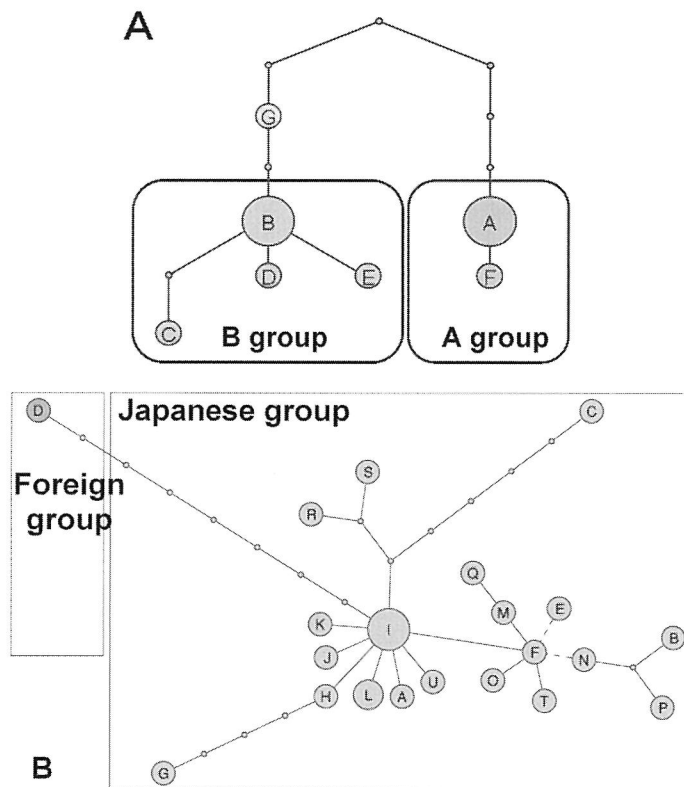


Fig. 5 Haplotype networks of the mycobiont (A) and photobiont (B) of *Flavoparmelia caperata*. Haplotype networks was obtained by a Cytoscape program. Haplotypes of the mycobiont are separated A (haplotypes of A and F) and B groups (haplotypes of B, C, D and E), on the other hand, haplotypes of the photobiont are foreign (haplotype of D) and Japanese groups (other haplotypes except D).

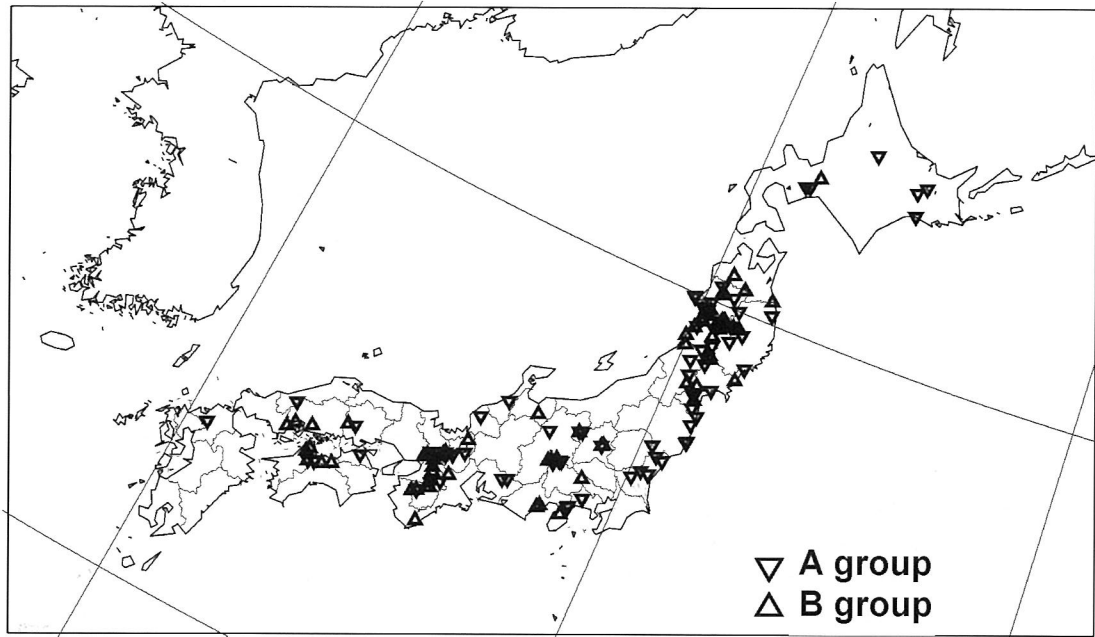


Fig. 6 Distribution of haplotypes of the mycobiont of *Flavoparmelia caperata* in Japan. △ and ▽ are A and B groups, respectively.

地衣類の分子系統分類 従来、化学的な分類で別種とされたシラチャウメノキゴケ *Canoparmelia aptata* とタナカウメノキゴケ *C. texana* について rDNA の ITS (ITS1+5.8S+ITS2) 領域の塩基配列による分類を試みた。その結果、Fig. 4 に示すように両者は 1 つのクレードに収まり、同種の可能性が示された。

地衣類の菌および藻のハプロタイプ解析 全国地衣類分布調査で北海道から本州・四国・九州に至る地点で収集したキウメノキゴケ *Flavoparmelia caperata* について菌および藻のハプロタイプ解析を試みた。その結果、菌類は 6 タイプあり、大きく 2 つのグループに分かれた (Fig. 5A) もの、それぞれの分布に偏りは見つからなかった (Fig. 6)。一方、共生藻は 20 タイプあり、高い遺伝的多様性を示したが、1 つのグループにまとまった (Fig. 5B)。

考 察

地衣菌および共生藻の分離培養 日本産の地衣類は 317 属約 1600 種が知られている (Harada *et al.*, 2002)。本研究において孢子培養法および組織培養法による培養に成功した種は 127 属約 300 種であり (Table 1)、全体の約 40% の属、約 20% の種の培養に成功したに過ぎない。しかも培養に成功した種は特定の科に集中する傾向があり、Cladoniaceae や Parmeliaceae、

Ramalinaceae, Stereocaulaceae, Umbilicariaceae がその代表であった。本研究の結果、目で 2 目 (Agyriales と Gyalectales)、科では 38 科で培養されていないことが明らかになった。特に、*Lecidea* など痂状地衣と *Peltigera* など藍藻共生地衣では多くの属で培養されていないことがわかった。これは痂状地衣の分類が非常に難しいためである。また、藍藻共生地衣は培養条件が緑藻共生地衣とは異なり、その条件が明らかにされていないためであると考えられる。

孢子培養法の長所は簡便なことであり、子器をつけることが多い痂状地衣には大変有利である。一方、短所は子器をつけない種が多い樹枝状や葉状地衣への適用が難しいことである。また、子器をつけている種でも誘導率は約 30% と低い。組織培養法の長所は、誘導率が 80% と高く、地衣菌と共生藻の両方を同時に分離できることである。短所は地上生の地衣類が雑菌汚染しやすいことと、汚染菌との区別が難しいことが挙げられる。後者の問題は遺伝子解析で解消できると思われる。

組織培養法により、共生藻の分離が可能となり、約 50 株を培養することができた。

地衣菌株の培養保存 地衣体や構成する菌類、共生藻の凍結保存性についての報告はほとんどなかった。そのためこれら培養株の凍結保存条件などはいっさい明らかではなかった。構成する菌類について、多くの菌株が液体窒素中で凍結保存条件できることが今回の

我々の研究で明らかになった。凍結保存性は科や属とは無縁で種固有の性質であると思われる。

地衣類の国内分布 イギリスでは主な地衣類の国内分布が100年前から明らかになり、温暖化など環境変動の影響が地衣類の分布から明らかにされつつある。しかし、日本では地衣類のチェックリスト (Harada *et al.*, 2002) が完成したものの、地衣類の分布報告には研究者の居住地に起因する地域的な偏りがあった。今般、初めて主要12種の国内分布を明らかにできた。この分布調査を継続することによって日本の地衣類の全貌を明らかにしたい。

地衣類の化学分類 地衣類は形態的によく似た種類が多く、そのために含有成分を指標とした分類、いわゆる化学分類研究が盛んに行われてきた。特殊な試薬による呈色反応を分類の第一指標とするのは、通常の場合であれば呈色するはずであるが、量がすくないために呈色しないこともあり、また少ない含有量の成分でも呈色しやすい成分であれば呈色してしまうこともあり、そのため分類が混乱する恐れがある。本研究でのトゲウメノキゴケモドキ *Parmelinopsis horrescens* の結果は呈色反応で分類する困難性を明らかにしている。また、コエダアカミゴケ *Cladonia pseudomacilenta* とタナカウメノキゴケ *Canoparmelia texana* の結果は、成分分析で分類同定することの困難性を明らかにしている。

地衣類の分子系統分類 化学成分や形態では分類同定できないシラチャウメノキゴケ *Canoparmelia aptata* とタナカウメノキゴケ *C. texana* を最終的に分類同定するには分子系統解析を行うしかない。今回得られた結果では、国内産のシラチャウメノキゴケとタナカウメノキゴケは同一のクレードであり同種である。このように化学分類で別種とされたものが分子系統で同種である可能性は今後多くの事例が出てくると思われる。

地衣類の菌および藻のハプロタイプ解析 これまで地衣類のハプロタイプ解析は日本では知られておらず、本研究によりキウメノキゴケ *Flavoparmelia caperata* の菌および藻のハプロタイプの実態をはじめて明らかにできた。キウメノキゴケの菌は海外でも見つかっている B 型や G 型が祖先的なタイプと考えられ、国内には B 型と A 型が独立に移入し分布を広げたと推察される。今後、地衣類のハプロタイプの種類や分布のデータが蓄積することによって、地衣類全体の日本への分布の広がり方が明らかにされるだろう。

要 約

3 年間の助成期間中に国内海外合わせて約2000の標本を採集し、胞子培養法および組織培養法による地衣菌と共生藻の分離を試み、その分離範囲とその条件が推定できた。組織培養法により、共生藻の分離が可能となった。国内公共利用機関に初めて地衣培養株を寄託した。凍結保存条件が明らかになった。国内に広く分布し、分類同定が容易である日本産12種についてその分布を明らかにした。形態的に類似するために従来呈色反応により化学的に分類同定されていたトゲウメノキゴケ群とイオウゴケ群、シラチャウメノキゴケ群について、多数の標本の HPLC 分析を行った結果、化学的には分類できないことがわかった。化学分類で別種とされた *Canoparmelia aptata* と *C. texana* が分子系統で同種である可能性を示した。 *Flavoparmelia caperata* の菌及び藻のハプロタイプ分布を明らかにした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 黒澤実里, 原 光二郎, 高橋奏恵, 小峰正史, 山本好和 (2007). 地衣類キウメノキゴケの遺伝的変異の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜).
- 山本好和 (2007). 地衣類の重要性 東北の自然, 環境の指標. 日本植物学会東北支部第20回大会公開シンポジウム 2 (秋田).
- 高橋奏恵, 山本好和 (2007). 日本産トリハダゴケ属の化学成分と形態. 日本植物学会第71回大会 (野田).
- 山本好和, 安齊唯夫, 加藤裕一 (2007). 大台ヶ原山の地衣類相. 日本植物学会第71回大会関連集会「日本地衣学会集会」(野田).
- 山本好和, 高橋奏恵, 原 光二郎, 小峰正史 (2007). 地衣類の HPLC 分析から得られた新たな知見 II. 日本地衣学会第 6 回大会・シンポジウム (吹田).
- 成田朱望, 高橋奏恵, 原 光二郎, 小峰正史, 山本好和 (2007). 地衣類の耐凍性・耐高温乾燥性スクリーニング. 日本地衣学会第 6 回大会・シンポジウム (吹田).
- 山本好和 (2006). オーストラリアの地衣類. 日本植物学会第70回大会関連集会「日本地衣学会集会」(熊本).
- 山本好和, 安齊唯夫, 坂東 誠, 木下靖浩, 高萩敏和, 小林寿宣 (2006). 日本産地衣類の分布調査. 日本地衣学会第5回大会・シンポジウム (東京).

原著論文

- Yamamoto, Y., Takahashi, K., Hara, K., Komine, M. & Yoshimura, I. (2007). 分布資料 (19). チダレヨロイゴケ *Lobaria crassior*. *Lichenology* 6: 21-24.
- Yamamoto, Y., Okada, Y., Takahashi, K. & Yoshimura, I. (2007). 豊田市香嵐溪の地衣類. *Lichenology* 6: 109-113.

保存機関に寄託した菌株

本助成で得られた地衣培養株を NRBC に寄託を予定している。寄託予定培養株の一覧を Table 2 に示した。地衣培養株の国内公共利用機関への寄託は初めてのことである。

Table 2 Lichen mycobionts which will be deposited to NBRF.

Species	Culno ¹	Origin ²
<i>Bryoria furcellata</i>	1231M	Thallus
<i>Bulbothrix isidiza</i>	1201M	Thallus
<i>Canomaculina subinctoria</i>	1203M	Thallus
<i>Cladonia amaurocraea</i>	1218C	Thallus
<i>Cladonia granulans</i>	1225M	P Spore
<i>Coccotrema porinopsis</i>	1211M	Thallus
<i>Dibaeis baeomyces</i>	1233M	Thallus
<i>Haematomma puniceum</i>	1229M	Thallus
<i>Heterodermia hypochraea</i>	1232M	Thallus
<i>Hypogymnia nikkoensis</i>	1210M	Thallus
<i>Hypogymnia metaphysodes</i>	1209M	Thallus
<i>Hypotrachyna koyaensis</i>	1221M	Thallus
<i>Hypotrachyna osseovalba</i>	1240C	Thallus
<i>Hypotrachyna revoluta</i>	1205C	Thallus
<i>Imshuagia aleurites</i>	1219M	Thallus
<i>Karoowia saxeti</i>	1207C	Thallus
<i>Lecanora pulverulenta</i>	1228M	P Spore
<i>Myelochroa galbina</i>	1226M	P Spore
<i>Ochrolechia yasudae</i>	1227M	P Spore
<i>Parmotrema praesorediosa</i>	1204M	Thallus
<i>Ramalina geniculata</i>	1217C	Thallus
<i>Rimelia hawaiiensis</i>	1206C	Thallus
<i>Tephromela americana</i>	1222M	P Spore
<i>Tephromela americana</i>	1223M	P Spore
<i>Trypethelium eluteriae</i>	1224M	P Spore
<i>Usnea pangiana</i>	1208C	Thallus
<i>Xanthoparmelia orientalis</i>	1216C	Thallus
<i>Xanthoparmelia tuberculiformis</i>	1220C	Thallus
<i>Xanthoria mandschurica</i>	1202M	Thallus

1 M, mycobiont; C, coexistence of mycobiont and photobiont

2 Thallus, from thalli; P Spore, from spores

謝 辞

最初に本研究に対し3年間助成して頂いた財団法人発酵研究所の関係者各位に厚く御礼申し上げます。また本研究にご指導、ご助言を賜った吉村庸元高知学短期大学学長に感謝申し上げます。国内地衣類の採集および分布調査には、安斉唯夫氏、川又明德博士、木下靖浩博士、小林寿宣氏、高萩敏和氏、原田浩博士、坂東誠博士に御世話になりました。深謝します。また、韓国順天大学地衣類研究所 Jae-Seoun Hur 博士、マレーシア科学大学 Lai Keng Chan 教授、タイ国・ラムカンハン大学 Ek Sangvichien 博士にも採集・調査にご協力頂きました。深謝します。また塩基配列の決定は秋田県立大学バイオテクノロジーセンターで行いました。担当の方々に深謝します。

文 献

- Asahina, Y. & Shibata, S. (1954). Chemistry of Lichen Substances. Kawade Shobo, Tokyo.
- Harada, H., Okamoto, T. & Yoshimura, I. (2004). A checklist of lichens and lichen-allies of Japan. *Lichenology* 2: 47-65.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. (1996) Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin.
- 山本好和 (2001). 地衣類の生物活性および生物活性物質. 植物の化学調節 35: 169-172.
- 山本好和 (2007). 地衣類初級編. 三恵社. 名古屋.
- Yamamoto, Y., Kinoshita, Y., Matsubara, H., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, T., Kurokawa, T. & Yoshimura, I. (1998). Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res. in Phytochem.* 2: 23-34 (1998).
- Yamamoto, Y., Kinoshita, Y. & Yoshimura, I. (2001). Culture of thallus fragments and redifferentiation of lichens. In Kranner I., Becknett R. & Varma A. (eds.) *Methods in Lichenology*: 34-46. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 吉村庸 (1974) 原色日本地衣植物図鑑. 保育社. 大阪.
- 吉村庸, 原田浩, 岡本達哉, 松本達雄, 宮脇博巳, 高橋奏恵 (2006). 日本産地衣類の分類体系. *Lichenology* 5: 95-110.
- Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Nakano, T. & Finnie, J. (2001). Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. In Kranner I., Becknett R. & Varma A. (eds.) *Methods in Lichenology*: 3-33. Springer-Verlag, Heidelberg.

南西諸島沿岸域からのプラシノ藻類を中心とした 微細藻類の分離・培養と系統分類学的研究

須 田 彰一郎

琉球大学理学部海洋自然科学科
〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1

Isolation, cultivation and phylogenetic studies of microalgae, particularly prasinophytes from coastal waters of the Nansei Islands, Japan

Shoichiro Suda

Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science,
University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

The coasts of the Nansei Islands are influenced by the Kuroshio warm current and have a unique and rich biological diversity exemplified by coral reefs, mangrove forests and other ecosystems. Recently, however, many ecosystems have been damaged by global warming and several anthropogenic activities. The environment of these ecosystems are drastically undergoing degradation so inhabiting organisms and even microalgae could possibly become extinct in the near future. Hence the establishment of microalgal culture strains from such ecosystems are urgently necessary. Among the various kinds of microalgae, prasinophytes were the primary target of this study. From 2002 to 2007, a total of 226 microalgal strains belonging to approximately 36 genera were isolated and established mainly from coastal wet sand samples. Among them 161 strains were assigned to prasinophytes composed of 85 *Nephroselmis* strains, 56 *Pyramimonas* strains and 20 strains of other prasinophyceans including *Micromonas*, *Ostreococcus*, *Pycnococcus* and *Tetraselmis*. The 85 *Nephroselmis* strains contained 12 strains of four known species and the 56 *Pyramimonas* strains contained five strains of three known species, but the other strains of both genera apparently contained many undescribed species. Further detailed studies are needed to characterize these potentially novel strains. Additionally, isolates of picoeukaryotic phytoplankton strains, potentially free-living zooxanthellae strains and the uncultivable *Lyngbya* which is used as home and for food by pistol shrimp are also discussed.

Key words: microalgae, picoeukaryotic plankton, prasinophytes, Ryukyu Islands, zooxanthellae

緒 言

南西諸島（琉球列島）沿岸域は、暖流である黒潮の影響により、生物地理学的には熱帯性の海洋生物が分布するインド・西太平洋域に属するとされ、サンゴ礁やマングローブ域をはじめとするユニークな生態的環境を有し、多様な生物を育む場として重要である。しかしながら、近年、一般家庭や農業排水の流入による富栄養化や、浅海域の埋立事業などの直接的な人為影響と、地球温暖化の影響と言われる高水温に伴うサンゴの白化現象などにより、その環境は急速に失われつつある。本研究では、急速な変化の過程にある琉球列

島沿岸域からできるだけ多くの微細藻類の分離・培養を試み、培養株の確立を推進することを第一の目的とした。あわせて、分離株の形態学的観察と分子遺伝学的系統解析による系統分類学的研究を行い、公的な株保存機関への保存株の寄託を最終的な目標としている。

本研究では特に緑色植物の起源的な生物を含み、多様な生物群で構成されているプラシノ藻類を中心に、分離・培養と系統分類学的研究を行ってきた。本報告では、まずプラシノ藻類のネフロセルミス属（期間中にネフロセルミス綱藻類として独立した綱であると報告されている [Nakayama *et al.*, 2007]）とピラミモナス属について分離株の概要と特徴を述べる。さらに、分離方法を変えることで新たに分離することができたピコプランクトンと、サンゴの共生藻類として知られ

ている褐虫藻の分離培養を紹介し、テッポウエビが巣として利用するシアノバクテリアのリングピア属の分離培養の失敗例を述べ、最後に今後の微細藻類研究の展開と展望を述べる。

実験方法

採集と粗培養 琉球列島（北，中，南琉球）各地沿岸域の表面海水と水深 10 cm～10 m 程度の海底表面の砂と海水を採集し分離源として用いた。シアノバクテリアの *Lyngbya* 属は、集塊となっている藻体を直接採集した。採集地は、北から種子島、奄美大島、沖永良部島、与論島、沖縄島、渡嘉敷島、宮古島、石垣島、西表島、波照間島で、沖縄島を除きほとんどの場所は一回採集したのみであるが、沖縄島では同一地点で複数回採集を行った。採集地を Fig. 1 に示した。採集物は直径 9 cm のプラスチックシャーレに入れ、採集した海水には IMK 培地（日本製薬）の濃縮液を加えて培地の濃度に調整し、砂には濾過海水で調整した IMK 培地を添加し、珪藻の増殖を抑制するために、二酸化ゲルマニウムを 5 mg L^{-1} となるように添加して粗培養を行った。ピコプランクトンの分離には、口径 $2 \mu\text{m}$ のヌークレポアーフィルター（ワットマン）で自然濾過した海水を段階的に希釈して 48 穴の培養プレートで粗培養を行った。培養条件は、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、14 : 10 時間明暗周期、昼光色蛍光灯を用い、約 $40 \mu\text{Ein m}^{-2}$

sec^{-1} の光強度で培養した。

分離 倒立顕微鏡で観察しながら、目的藻類をピペット洗浄法で分離し、あらかじめ準備した IMK 培地の分注された試験管に単一細胞（ないしは単一コロニー）ずつ分離し培養した。ピコプランクトンは単細胞分離が不可能であったため、単一藻類になるまで希釈培養を繰り返して分離株として確立した。培養条件は上記粗培養条件と同様である。

株の維持・保存 すべての株の維持・保存は継代培養保存法で行った。継代期間はほとんどの株で 1 ヶ月としたが、増殖が早いピコプランクトンの一部は、1 週間で行った。ピコプランクトンは、凍害防御物質を使用せずに -80°C の超低温冷凍庫での凍結保存を試みたがすべて失敗した。

形態観察（光学顕微鏡、電子顕微鏡）および分子遺伝学的系統解析 分離培養に成功し、確立できた株は、Suda (2004) に則り、光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態観察と分類群に合わせて、18S rDNA, *rbcL* 遺伝子および 18S-28S rDNA の ITS 領域の塩基配列を決定し、分子遺伝学的系統解析を行い、形態と分子により特徴づけた。ただし、本報告では、18S rDNA 塩基配列から得られた結果のみを示した。

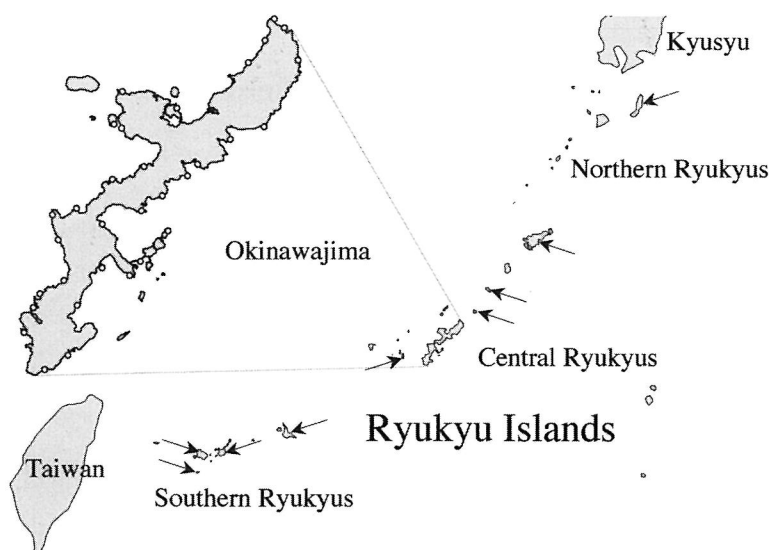


Fig. 1 Map of the Ryukyu Islands.
The sampling areas are indicated by arrows in the Ryukyu Islands and by small circles in the Okinawajima Island.

結果と考察

分離培養 研究当初は採集してきた海水及び海底の砂をそれぞれ粗培養し、微細藻類の増殖が肉眼で確認できる（培養液が色づくまで）まで待ってから分離を試みたが、狙いとしたプラシノ藻類の出現頻度は低く、ほとんど分離できなかった。そこで粗培養直後から倒立顕微鏡で観察し、1細胞でもプラシノ藻類様の細胞を見つけたら直ちに分離するように変更したところ、海底の砂サンプルにおいて分離効率を上昇させることができた。また、サンゴ礁域のどこから採集した砂がより多く分離できるかを調べるため、同一海岸の岸から沖合までの、波打ち際－礁池－礁原－礁縁外をいくつかに分け、ほぼ直線上に採集し比較したところ、礁池と礁縁外から多く分離でき、波打ち際と礁原からはほとんど分離できなかった。シアノバクテリアのマットや海草、海藻などのサンプルも試したが、傷みが早く、プラシノ藻類の出現もなかったため以後用いなかった。なお、礁池内どうしでの比較では、数メートル、

極端な場合十数センチ離れているだけで出現する微細藻類が大きく異なることもあった。

ネフロセルミス属 (*Nephroselmis*) プラシノ藻類は、プラシノ藻綱 (*Prasinophyceae*) として不均一な他系統の藻類の混合であることが形態学的にも、分子遺伝学的にも理解されていながら、それぞれの系統群の整理は手つかずにあった。この中で、ネフロセルミス属に関しては、単独の綱として新たに定義され直され、ネフロセルミス藻綱とされた (*Nakayama et al.*, 2007)。ネフロセルミス藻は、細胞が扁平で楕円形や豆型、長短2本の鞭毛を有し、短鞭毛を前に、長鞭毛を後ろにして遊泳する。葉緑体は一枚で、細胞の背側に1つのピレノイドを有する。眼点は通常一つあり、単鞭毛基部の葉緑体内に存在する。細胞の大きさは5～10 μ m程度で、特徴的な遊泳の様子から、容易に他の微細藻類との区別をつけることができる。生育環境（淡水産か海産か）、細胞の大きさ、形態、眼点の大きさ、デンプン粒の形態などの光学顕微鏡下の識別形質で、いくつかの種類は同定可能である。さらに、細胞

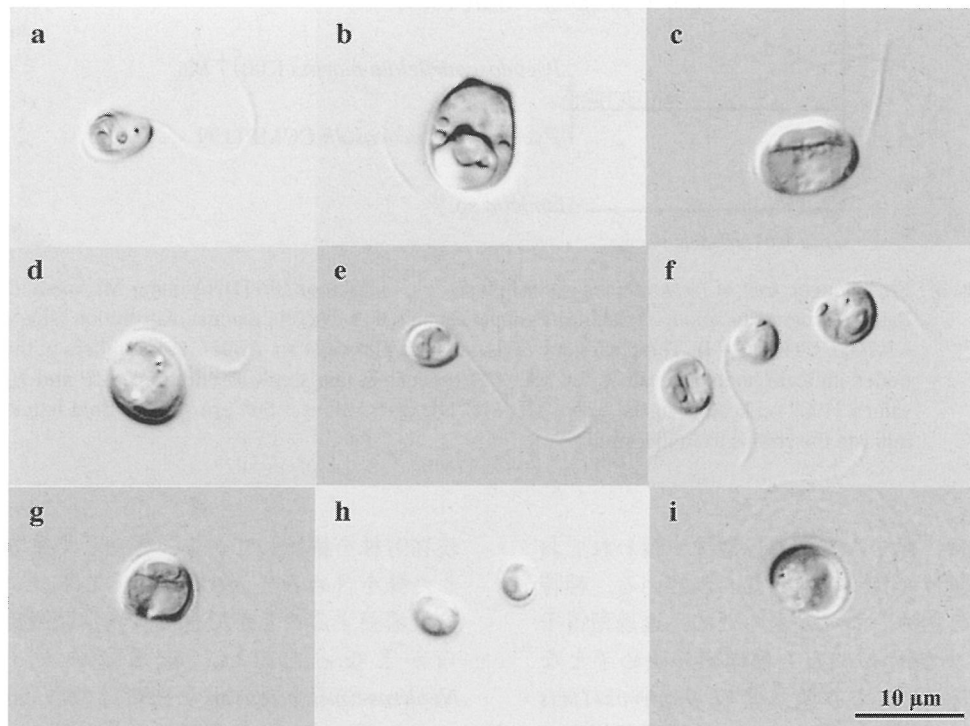


Fig. 2 Light micrographs of distinct *Nephroselmis* strains from this study. a, Strain B2N5 identified as *N. anterostigmatica*, b, Strain HaeNep identified as *N. astigmatica*, c, Strain Sen4 identified as *N. olivacea*, d, Strain BS4-3 identified as *Nephroselmis* sp2, e, Strain Nh4 identified as *N. pyriformis*, f, Strain Ten4Np identified as *Nephroselmis* sp3, g, Strain MIY2-1 identified as *Nephroselmis* sp4, h, Strain B2N2 identified as *Nephroselmis* sp5, i, Strain Sera3-5 identified as *Nephroselmis* sp6. All micrographs are the same magnification.

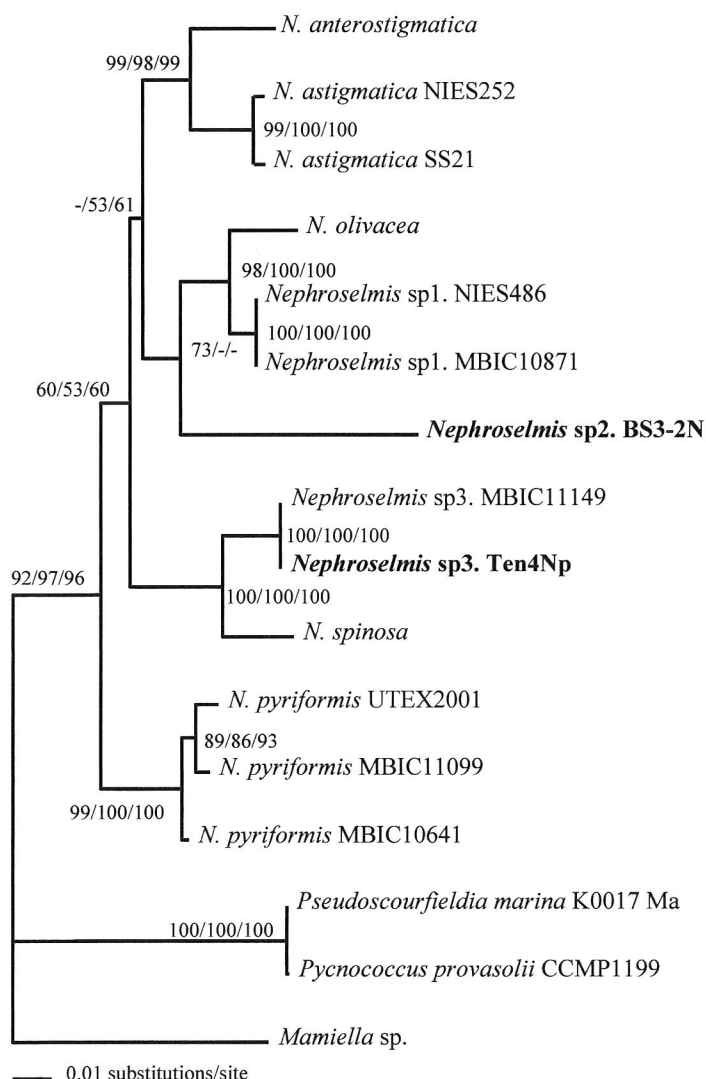


Fig. 3 Phylogenetic tree of *Nephroselmis* species based on 1446 bp of 18S rDNA using ML method. Rate heterogeneity among variable sites approximated as a discrete gamma distribution (shape = 0.7905; GTR + G + I). The phylogeny is rooted with *Mamiella* sp. AB017129. Numbers at the nodes indicate bootstrap values for ML (100 replicates, fast stepwise addition), MP and NJ values (1000 replicates) in the order ML/MP/NJ. Only values > 50% are shown. Bold letters indicate the strains from this study.

表面と鞭毛表面は、微小な有機質の鱗片で覆われており、特有の星形鱗片を持つことが知られている。種特有の鱗片の形態と組み合わせがあるため、透過型電子顕微鏡観察による鱗片の観察も種同定の決め手となる。1878年のSteinにより淡水産の *Nephroselmis olivacea* が報告されて以来、いくつかの種類が報告されてきたが、現在8種類が真に存在すると考えられている (Suda & Faria, 2008. *in press*)。

上記のような特徴的な遊泳をする細胞を分離培養し、採集地ほぼ全域から分離培養することができた。本助成研究の始まる前から保存している十数株を含め

現在91株を維持している。株として確立できた後死滅した株を含めると100株を超えるネフロセルミス属を分離培養することができた。光学顕微鏡観察により明らかとなったのは、淡水産のタイプ種である *Nephroselmis olivacea* と海産種の *N. astigmatica*, *N. anterostigmatica*, *N. pyriformis* の3種で、加えて、より詳細な形態観察と18S rDNAと *rbcL* 遺伝子塩基配列系統解析に基づく分子遺伝学的系統解析結果を得なければはっきりさせることはできないが、*N. gaoae*, *N. minuta*, *N. rotunda* の既知種3種の存在の可能性も示唆された。既知種の中で明確に存在が否定できたのは、

N. spinosa であった。本種は西オーストラリアから採集された砂サンプルから分離培養され新種として記載されている (Suda, 2003)。これらのことから、琉球列島沿岸域は *N. spinosa* を除く、ほぼすべての既知ネフロセルミス属種が存在している可能性が判明した。加えて、多くの分離株は光学顕微鏡観察から既知種とは同定できず、未記載種である可能性が高くなった (Fig. 2)。これらのことから、ネフロセルミス属に関しては琉球列島沿岸域で非常に高い種多様性があることがわかった。形態的に未記載種の可能性が高い2つの株グループについてDNA抽出し、18S rDNA塩基配列を決定したところ、それぞれのグループは同一となり、既知種のデータとあわせて分子遺伝学的系統解析を行ったところはっきりと異なる系統群として認識できた (Fig. 3)。現在、記載論文の準備を進めながら、光学及び電子顕微鏡による詳細な形態観察を始め、分子遺伝

学的系統解析が不十分な残りの多くの分離株の整理を順次行っている。

ピラミモナス属 (*Pyramimonas*) ピラミモナス属は、プラシノ藻綱の中でハロスフェラ属、キンボモナス属、プテロスペルマ属などともに分子遺伝学的に単一の系統群をなすことが知られているが、分類学的な整理はなされていない。単細胞性で細胞前端部の凹みから生じる通常4本の等長鞭毛を有し、細胞全体は、前方部の幅が広く、逆さまの円錐、四角錐、釣り鐘型などの形態をとることが多い。細胞表面と鞭毛に特徴的な微小鱗片を有し、鱗片の形態は、種の基準として利用されている。1850年に Shmarda により淡水産の *Pyramimonas tetrarhynchus* がタイプ種として記載されて以来、海産種が多く知られ、現有種は50種とも80種とも言われている。細胞の大きさは5~20 μ m程度の

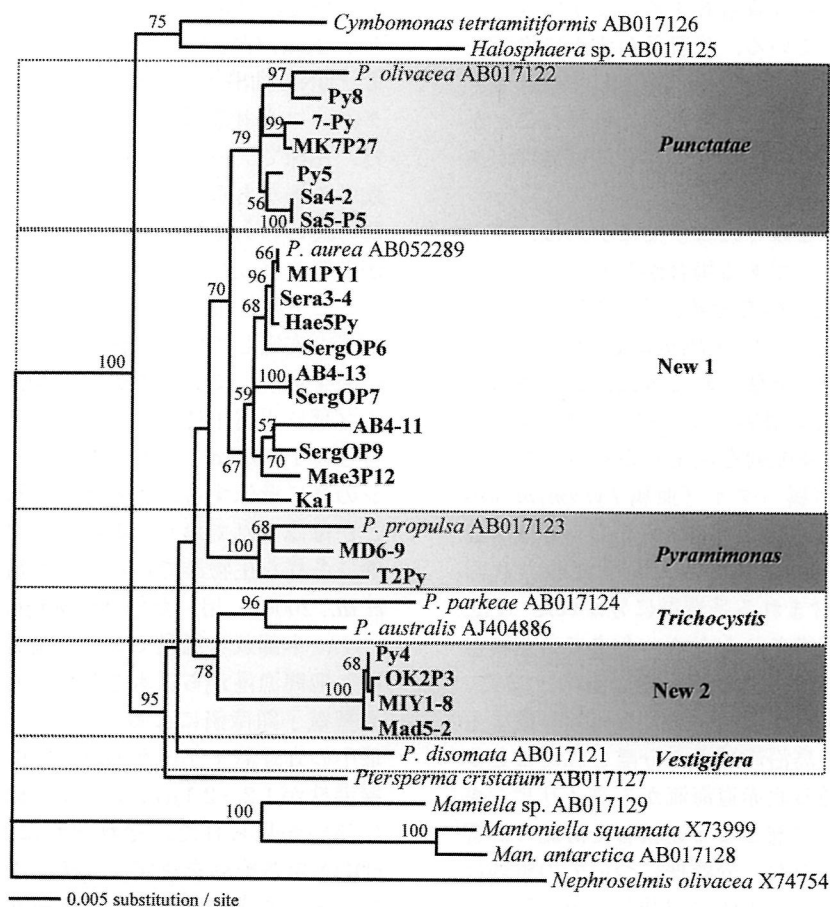


Fig. 4 Phylogenetic tree of *Pyramimonas* species based on 18S rDNA using NJ method. The phylogeny is rooted with *Nephroselmis olivacea* X74754. Numbers at the nodes indicate bootstrap values derived from 1000 replications. Only values > 50% are shown. The bold letters for strain names are from this study. The six distinct clades correspond to subgenera *Punctatae*, *Pyramimonas*, *Trichocystis*, *Vestigifera* and two new groups.

種が多く、小さい上に細胞壁がないため、光学顕微鏡観察のみによる電子顕微鏡観察以前の記載は曖昧な場合が多い。分類同定には、できるだけ多くの正確な光学顕微鏡観察と電子顕微鏡による鱗片の観察に加え、ピレノイドや眼点の特徴などの細胞内微細構造観察が必要で、これらの形態的特徴と過去の曖昧な記載とから新たに判断して、一種類ずつ再記載する必要がある。このように、形態観察が容易ではないため、分子遺伝学的な情報（18S rDNA や *rbcl* 遺伝子）の蓄積も必要となる。このため、正確な分類がなされた分離培養株をできるだけ多く公的な微生物保存機関に寄託することが望まれる。

温帯から高緯度地域にかけての報告に比べて、熱帯・亜熱帯海域からの報告はほとんどないため、生物地理学的に熱帯性の海洋生物が分布するインド・西太平洋域である琉球列島沿岸からの本属藻類の報告は貴重な知見となる。サンプル中に出現した遊泳中の細胞をマイクロピペットにより一細胞ずつ分離して培養した。採集地はほぼ全域から分離培養することができ、現在52株を確立し維持している。分離後わずかに増殖が見られた後、死滅したものが多く、株として確立できない場合が多かった。わずかな増殖が見られたことから培養液組成の検討により株が確立できる可能性があり、今後の課題となった。

今まで報告されている多くのピラミモナスは、海水中に現れるプランクトンである場合が多かったのに対し、本研究では、海底の砂を分離源としているため、今まであまり報告されていない *Punctatae* 亜属に属すると思われる種類が多く分離されてきた。光学顕微鏡観察により異なる形態で増殖のよい株から DNA を抽出し、18S rDNA の塩基配列を決定し系統解析を行ったところ *Punctatae* 亜属（タイプ亜属 *Pyramimonas olivacea*）の含まれる系統群とパラオ沿岸から分離培養された *Pyramimonas aurea* として新種記載された（Suda, 2004）種類が含まれる系統群に分かれた（Fig. 4）。新たな系統群が認識されたため、今までの亜属の分類方法では不十分であることが示唆された。また、*P. aurea* と形態的にも分子遺伝学的にもほぼ一致する分離株が西表島と沖縄島沿岸域から分離されたことから、パラオ沿岸域も通る北赤道海流からフィリピン東岸で北東に進路を変え黒潮となる連続した海流の影響が示唆できるだろう。なお、分離株についての整理はまだ途上であり、一つ一つ正確に記載し、公表していく予定である。

ピコ植物プランクトン 琉球列島沿岸域は黒潮の影響により栄養分が少なく、透明度が高い。これは水中

に浮遊する植物プランクトンが少ないことを意味している。しかし蛍光顕微鏡により観察すると微細なクロロフィル蛍光を持つ顆粒を多数観察することができる。これらは、主にシアノバクテリアのシネココッカスとプロクロロココッカスで、1ml あたり数千から数万細胞含まれていることが知られており、生態的にも重要な働きをしているものと考えられている（Jiao *et al.*, 2005）。これらのピコ植物プランクトンを分離する目的で、海水をボアサイズ 2 μ m のフィルターでろ過し、ろ液の希釈培養を試みた。培養液が適さなかったためシネココッカスなどのピコシアノバクテリアの培養はできなかったが、代わりにピコ真核植物プランクトンを分離培養することができた。沖永良部島、沖縄島、宮古島、石垣島から採集したサンプルから、現在20株を確立し保存しているが培養は不安定である。内訳はプラシノ藻類のミクロモナスが8株、オストレオココッカスが6株と複数分離でき、ピクノココッカス1株と20株中15株がプラシノ藻類であった。残りは未知の不等毛藻類と緑藻類であった。いずれの場合も細胞の大きさが2 μ m 程度と小さいため、形態学的な分類は困難で、DNA 抽出から18S rDNA 塩基配列を決定し、データベースと比較することで近縁の藻類の検索を試みた。13株でデータを得ることができ、既知データと一致する株がある一方で、最も近縁な既知データと19塩基の違いのある株もあり、更なる詳細な分類学的検討が必要となった。

ここでは、最も多く分離できたミクロモナスのうち培養が安定していた5株についてより詳しく検討した結果を示す。ミクロモナスは *Micromonas pusilla* をタイプ種に1属1種の藻類で細胞は球形から卵形で、大きさは1~3 μ m、1本の鞭毛を後ろに、オタマジャクシの様に遊泳する。世界各地の海域に分布していることが確認されており、形態的に区別できないが、遺伝的に多様な生物群であることが知られている（Slapeta *et al.*, 2006）。用いた株は沖縄島的那覇港、宜野湾マリーナ、本部栽培漁業センター地先および宮古島の平良港と池間漁港から採水された海水から分離された。透過型電子顕微鏡によるネガティブ染色像の観察から、最小の宜野湾マリーナ株が長さ0.9~1.4 μ m、最大的那覇港株が1.2~2.1 μ m であり、株により細胞の大きさに違いが見られた。それぞれに DNA を抽出し、18S rDNA 塩基配列を決定し、データベースのミクロモナスのデータと環境 DNA のデータを用いて系統解析を行った。この結果得られて系統樹により分離株5株は、3つの系統群に分かれた（Fig. 5）。特に那覇港、宜野湾マリーナと平良港株は、西部太平洋域から分離された MBIC 10095 株と系統群を形成し、同じ西部太平洋

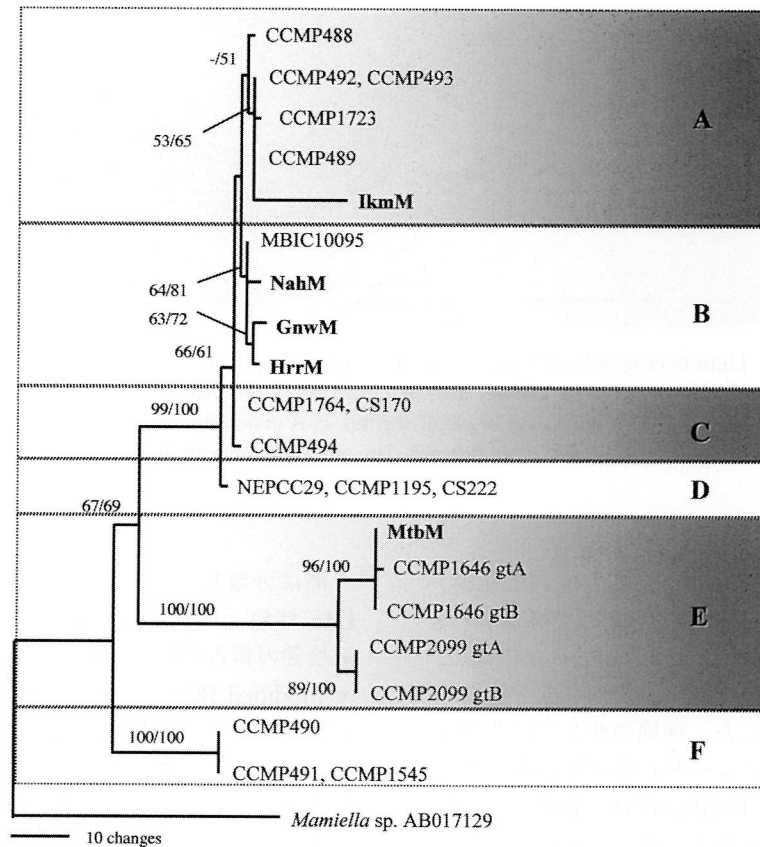


Fig. 5 Phylogenetic tree of *Micromonas pusilla* based on 18S rDNA using MP and ML methods. The phylogeny is rooted with *Mamiella* sp. AB017129. Numbers at the nodes indicate bootstrap values for MP (1000 replicates) and for ML values (100 replicates) in the order MP/ML. Only values > 50% are shown. Bold letters for strain names are from this study. Six distinct clades (A to F) are formed.

域という地域を反映した結果が得られた。しかし、残りの池間漁港株と本部株はそれぞれ大西洋－地中海の温帯域産の株と、北極海－地中海産の株と系統群を作り、地域を反映する傾向は見られなかった。いずれにしても *Micromonas pusilla* 一種として扱うには遺伝的に大きく異なるため無理がある。分子遺伝学的な違いと、形態学的な違いが合致すれば、再記載が可能になるが、今後の課題となった。

褐虫藻 サンゴ礁域の微細藻類といえば、造礁性のサンゴに共生して、光合成で得たエネルギーをサンゴに与えて（奪われて）いる褐虫藻（*Zooxanthella*）が最も多く存在するだろう。褐虫藻のほとんどは、渦鞭毛藻類のシンビオディニウム（*Symbiodinium*）属である。サンゴ礁域では、サンゴのみならず、ソフトコーラル、イソギンチャク、カイメン、無腸類、シャコガイなどの無脊椎動物や、有孔虫などにもこのシンビオディニウムが共生していることが知られている。形態

的に区別することが困難であるが、分子遺伝学的にはいくつかの系統群に分けることができ、クレードAとかクレードDなどという名称で、分類学的な整理がなされないままに扱われている（Lajeunesse, 2001）。このシンビオディニウムは、特徴的な回転運動と細胞の大きさが約8μm程度であることにより顕微鏡下で比較的容易に特定することができる。海底の砂サンプルからプラシノ藻類を分離する際に、シンビオディニウムと思われる細胞の分離も試みた。沖縄島の最北端の国頭村奥の海岸で採集した砂を粗培養し、特徴的な回転運動をするシンビオディニウム様藻類を分離培養した。一カ所から16細胞を分離し、14株を得た。同一地点から同じ微細藻類を多く分離できたことから、相補的な有性生殖を行なう株が含まれている可能性があるため、かけ合わせ実験を行なったが、有性生殖は誘起されなかった。この14株に加え、異なる2カ所から分離した2株について、形態観察では分けられないことを確認し、分子遺伝学的な違いがあるかを、リボゾー

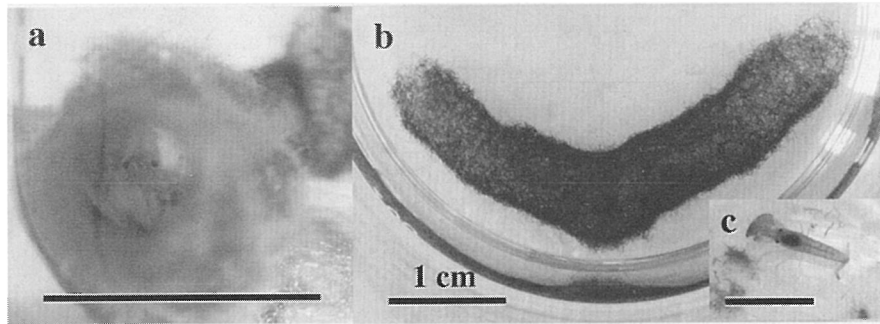


Fig. 6 Light micrographs of *Lyngbya* sp. and pistol shrimp living in it. a, A pistol shrimp (two round eyes are visible) lives in a tube made by *Lyngbya* filaments. b, A small tube like *Lyngbya* house of pistol shrimp. c, A pistol shrimp took from *Lyngbya* house. Right shrimp is larger than left. The scale bars indicate 1 cm.

ム RNA の ITS から 28S 領域の一部まで (1400塩基) の塩基配列を決定し、比較することで確かめた (Hirose *et al.*, 2008). 16株すべてはクレード A に属し、奥株は 2つの単系統群に分かれた。他の 2株もそれぞれ異なる単系統群に所属した。沖縄のサンゴに共生するシンビオディニウムはクレード C が主体になっていることが知られており (Magalon *et al.*, 2007), 今回、砂から分離されたシンビオディニウムがクレード A のみからなったことは異なる結果となった。サンゴは親から共生褐虫藻を受け継ぐ種類と、環境中から褐虫藻を取り込んで共生が開始する種類とがあり、後者の場合は環境中の褐虫藻が重要になってくる。今回得られた結果だけからは、環境中にはクレード A の褐虫藻が多いのか、たまたまクレード A の多いサンプルだったのかを判断することは難しいが、サンゴを壊して取り出した褐虫藻 (クレード C など) も分離培養できる培地と培養条件を使っているの、培養の成否による違いではないと考えている。サンゴ礁域が失われつつある現在、褐虫藻研究の更なる進展が望まれる。

リングビア属 (*Lyngbya*) サンゴ礁域をはじめとして、熱帯・亜熱帯の沿岸域に大量増殖が報告されるようになってきた藻類に、シアノバクテリアのリングビア属 (*Lyngbya*) とその近縁属があげられる (Paul *et al.*, 2005). 有毒な生理活性物質の報告もあり (Pennings *et al.*, 1996), 今後の環境変化により構成種の組成が大きく変わる恐れがあることから早急に株を確立しようと考えた。特に、特定のテッポウエビの種類が糸状体を編み上げて袋状の巣を作り、その中で生活することが知られているリングビアの仲間の分離培養を試みた (Fig. 6). 沖縄島の沿岸域数カ所から糸状体の巣の中にいるテッポウエビごと採集し、糸状体の

一部は分離培養に供した。本研究全体で用いている IMK 培地 (日本製薬) のほかに、海産糸状ラン藻の分離培養の報告で用いられている ASW:BG (Allen, 1968) や Modified BG11 (Rossi *et al.*, 1997) などのいくつかの培養液を用い、粗培養とピペット洗浄法、寒天平板法、ディッピング・ドラッシング法 (寒天平板上で糸状体を引きずり回して表面の付着藻類や微生物を外す方法) などの方法による直接分離を試みた。巣を直接各種培養液に入れた場合、主に珪藻とほかのラン藻の増殖が著しく、狙いのリングビア様藻類の粗培養はできなかった。また、直接的に糸状体を分離して培養した場合でも増殖させることができなかった。巣とテッポウエビは、天然海水を入れたビーカーで数日ごとに海水を交換することで生かし続けることができたが、リングビアが増殖しないため、餌として食べられていき、3ヶ月程で死滅してしまった。テッポウエビの飼育ならば、天然からリングビアを採ってくれば可能であったかもしれないが、それでは本研究の目的である微細藻類の分離培養からは外れてしまう。環境中では、肉眼的にも大量に増殖していることが観察できるにも関わらず、培養に成功しなかったことは今後の課題となった。

今後の展開

現在研究室で維持している微細藻類株をできるだけ早く分類学的に特徴づけ、公的株保存機関への寄託を行なう必要がある。本研究で焦点を当てたブラシノ藻類のネフロセルミス属とピラミモナス属の結果から、当該地域のこれら 2 属の分離株には、多くの未記載種が含まれていることが判明し、琉球列島沿岸域の微細藻類多様性の高さを示した結果となった。同様の結果

は、ピコ植物プランクトンや褐虫藻でも示されており、遺伝子資源確保の意味でも様々な微細藻類について分離培養株の確立が必要であることが示唆された。一方、分離培養に成功しなかったテッポウエビが巣を作るリングピアが示すように、多くの微細藻類で分離・培養方法の検討が必要であることが改めて浮き彫りとなり、地道な分離・培養方法の検討を継続する必要性を痛感した。

要 約

琉球列島沿岸域は、暖流である黒潮の影響を受け、サンゴ礁域やマングローブ域といった特徴的で生物多様性の高い地域である。しかしながら、近年の地球温暖化によるサンゴの白化現象を始め、人的活動の被害を受けており、その環境は急速に失われつつある。そのため、微細藻類も含め、この地域の生物が近い将来絶滅することも考えられ、微細藻類の分離培養株を確立することが急務である。本研究では、ブラシノ藻類を中心に研究を進めた。2002年から2007年にかけて、本地域の主に沿岸域の海底の砂から、226株、約36属にわたる微細藻類株を確立できた。このうち161株はブラシノ藻類で、ネフロセルミス属が85株、ピラミモナス属が56株、ほか20株は、ミクロモナス属、オストレオコッカス属、ピクノコッカス属、テトラセルミス属であった。ネフロセルミス属85株中12株は4既知種に、ピラミモナス属56株中5株は3既知種に同定できたが、両属とも多くの未記載種が含まれる可能性が高いことが判明した。今後は、より詳細な分類学的研究が必要である。加えて、ピコ真核藻類分離株と自由生活と思われる褐虫藻株の分離培養について述べ、テッポウエビが巣として利用しているリングピア属の分離失敗例を紹介する。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 須田彰一郎・伊澤龍一 (2008). 沖縄県うるま市伊計島の沈砂池より分離したファコツス科藻類について (緑藻綱). 日本藻類学会第32回大会, 東京海洋大学 (3月22日, 23日).
- 2) Suda, S. & A. Taise, (2008). A preliminary study of diatom flora of the marine coastal area of Upolu Island, Samoa. 日本藻類学会第32回大会, 東京海洋大学 (3月22日, 23日).
- 3) Taise, A. & S. Suda, (2008). A study of marine benthic diatoms of the Cape Maeda coast, Okinawajima. 琉球大学21世紀 COE プログラム「サンゴ礁島嶼系の生物多様性の総合解析」平成19年度成果発表会, 琉球大学 (3月1日).
- 4) Shah, Md. M. R. & S. Suda, (2008). Dinoflagellate flora of the Cape Maeda coast, Okinawa. 琉球大学21世紀 COE プログラム「サンゴ礁島嶼系の生物多様性の総合解析」平成19年度成果発表会, 琉球大学 (3月1日).
- 5) Anahara, T., A. Kato & S. Suda, (2008). Picophytoplankton in coastal waters of the Ryukyu Islands. 琉球大学21世紀 COE プログラム「サンゴ礁島嶼系の生物多様性の総合解析」平成19年度成果発表会, 琉球大学 (3月1日).
- 6) 広瀬慎美子・James D. Reimer・日高道雄・須田彰一郎 (2007). 沖縄のサンゴ砂から分離された自由生活性と考えられる *Symbiodinium* spp. の系統解析. 日本サンゴ礁学会第10回大会, 琉球大学 (11月23日~25日).
- 7) Suda, S. (2007). The current situation regarding practical taxonomic treatment of Cyanobacteria / Cyanophytes. 21st Pacific Science Congress. June 12-18, Okinawa, Japan.
- 8) Suda, S. & D. G. Faria, (2007). Overview of the genus *Nephroselmis* from the Ryukyu Islands (Chlorophyta, Nephroselmidophyceae). International Workshop on Tropical Island Biodiversity: Across Land and Sea. National University of Singapore. September 25-29, Singapore.
- 9) 須田彰一郎 (2007): 琉球列島沿岸産 *Pyramimonas* 属の *Punctatae* 亜属について (Subgenus *Punctatae* in the genus *Pyramimonas* from Ryukyu Islands). 琉球大学21世紀 COE プログラム「サンゴ礁島嶼系の生物多様性の総合解析」平成18年度成果発表会, 琉球大学 (3月10日).
- 10) 須田彰一郎 (2007): 南西諸島沿岸域より分離されたブラシノ藻 *Pyramimonas aurea* とその近縁種について. 日本藻類学会第31回大会, 神戸大学 (3月24日, 25日).
- 11) 須田彰一郎 (2006). 沖縄島産ブラシノ藻 *Nephroselmis* 属の1未記載種の分類学的研究. 日本藻類学会第30回大会, 鹿児島大学 (3月27日, 28日).
- 12) 須田彰一郎 (2006). 沖縄県産ブラシノ藻 *Nephroselmis* 属の1未記載種の分類学的研究. 琉球大学21世紀 COE プログラム「サンゴ礁島嶼系の生物多様性の総合解析」平成17年度成果発表会, 琉球大学 (3月6日).
- 13) Suda, S. (2005). The genus *Nephroselmis* (Prasinophyceae, Chlorophyta) in the coastal waters of Okinawa, Japan. The 4th Asian-Pacific Phycological Forum, Bangkok, Thailand, 30 October to 4 November.
- 14) Suda, S. (2005). The genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta) from coastal waters around the Okinawa Island. 8th International Phycological Congress, Durban, South Africa, 13-19 August.
- 15) 須田彰一郎 (2005). 沖縄島沿岸域の微細藻類の多様性: ブラシノ藻類を例に. 生物の多様性-その成り立ちと保全-. 21世紀 COE「生物の多様性」, 京都大学・北海道大学・東京大学・琉球大学4拠点合同公開シンポジウム, コクヨホール, 品川, 東京 (6月18日).
- 16) 須田彰一郎 (2005). 沖縄島沿岸域の微細藻類の多様性-ピラミモナス属を例に. 公開シンポジウム「琉球

列島の生物研究の新たな展開」, 第42回沖縄生物学会, 第58回日本動物学会九州支部会, 第55回日本植物学会九州支部会, 第50回日本生態学会九州地区会, 合同大会, 琉球大学 (5月14日).

原著論文

- 1) Suda, S. & Faria, D.G. (2008). The genus *Nephroselmis* from the Ryukyu Islands. The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement (in press).

保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した微細藻類株 280 株あまりは現在, 琉球大学理学部須田研究室で保存している. 整理のついた株から, 国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES) への寄託を予定している.

謝 辞

本研究は, 琉球大学理工学研究科の広瀬慎美子博士との共同研究の一部と大学院生のファリア, ダフネ・ジョルジーナさんの修士論文研究の一部, ならびに琉球大学理学部の古賀暢子さんと穴原智英君の卒業論文研究の一部である. また, 海外での調査および研究発表の一部等は, 琉球大学21世紀 COE プログラム「亜熱帯島嶼系の生物多様性の総合解析」での研究助成により賄われた.

本研究の大部分は, 財団法人発酵研究所の研究助成 (平成17年度から3年間) を受けて行なわれたことに加え, 本助成により, 当該研究室の研究基盤充実に多大なる恩恵を与えていただいたことに深謝する.

文 献

- Allen, M.M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. **4**: 1-4.
- Hirose, M., Reimer, J.D., Hidaka, M. & Suda, S. (2008). Phylogenetic analyses of potentially free-living

Symbiodinium spp. isolated from coral reef sand in Okinawa, Japan. Mar. Biol. (DOI. 10.1007/s00227-008-1011-2).

Jiao, N., Yang, Y., Hong, N., Ma, Y., Harada, S., Koshikawa, H. & Watanabe, M. (2005). Dynamics of autotrophic picoplankton and heterotrophic bacteria in the East China Sea. Cont. Shelf Res. **25**: 1265-1279.

Lajeunesse, T.C. (2001). Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a "species" level marker. J. Phycol. **37**: 866-880.

Magalon, H., Flot, J.F. & Baudry, E. (2007). Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in pacific corals in the genus *Pocillopora*. Coral Reefs **26**: 551-558.

Nakayama, T., Suda, S., Kawachi, M. & Inouye, I. (2007). Phylogeny and ultrastructure of *Nephroselmis* and *Pseudoscourfieldia* (Chlorophyta), including the description of *Nephroselmis anterostigmatica* sp. nov. and a proposal for the Nephroselmidales ord. nov. Phycologia **46**: 680-697.

Paul, V.J., Thacker, R.W., Banks, K. & Golubic, S. (2005). Benthic cyanobacterial bloom impacts the reefs of South Florida (Broward County, USA). Coral Reefs. **24**: 693-697.

Pennings, S.C., Weiss, A.M. & Paul, V.J. (1996). Secondary metabolites of the cyanobacterium *Microcoleus lyngbyaceus* and the sea hare *Stylocheilus longicauda*: palatability and toxicity. Mar. Biol. **126**: 735-743.

Rossi, J.V., Roberts, M.A., Yoo, H.D. & Gerwick, W.H. (1997). Pilot scale culture of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* for its pharmaceutically useful natural metabolite curacin A. J. Appl. Phycol. **9**: 195-204.

Selapeta, J., Lopez-Garceia, P. & Antia, N.J. (2006). Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. Mol. Biol. Evol. **23**: 23-29.

Suda, S. (2003). Light microscopy and electron microscopy of *Nephroselmis spinosa* sp. nov. (Prasinophyceae, Chlorophyta). J. Phycol. **39**: 590-599.

Suda, S. (2004). Taxonomic characterization of *Pyramimonas aurea* sp. nov. (Prasinophyceae, Chlorophyta). Phycologia **43**: 682-692.

Suda, S. & Faria, D.G. (2008). The genus *Nephroselmis* from the Ryukyu Islands. The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement (in press).

皮膚微生物フローラの菌叢解析と機能解析に基づく
各種皮膚疾患治療法開発への応用
-真菌 *Malassezia* とアトピー性皮膚炎中心に-

杉 田 隆

明治薬科大学微生物学教室
〒204-8588 東京都清瀬市野塩2-522-1

Molecular analysis of cutaneous microbiota and its application to the development
of a new therapeutic method for microbiota-related skin diseases
-Example of *Malassezia* and atopic dermatitis -

Takashi Sugita

Department of Microbiology, Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588 Japan

Many microorganisms colonize human skin, where one of them cause several skin diseases, such as atopic dermatitis (AD), and seborrheic dermatitis (SD). In Japan alone, 10 million people have AD. However, no systematic study has examined the relationship between the cutaneous microbiota and skin disease. Therefore, this study conducted a comprehensive analysis of the cutaneous microbiota in several skin diseases and a clinical trial of AD treatment targeting *Malassezia* as an exacerbating factor. The cutaneous *Malassezia* microbiota of patients with AD, pityriasis versicolor (PV), and SD were analyzed using a culture-independent method. The major components in each skin disease were similar, although the ratios differed significantly; the predominant species in patients with SD and PV were *M. restricta* and *M. globosa*, respectively, while equal numbers of both species were colonized in patients with AD. The AD patients produced anti-*Malassezia*-specific IgE antibody, suggesting that cutaneous *Malassezia* is an exacerbating factor. Therefore, we next tried to reduce the cutaneous microorganisms using antifungal agents. Either topical ketoconazole (KTZ) or oral itraconazole (ITZ) was administered to adult AD patients who did not respond to standard AD therapy. Their symptoms improved on decreasing the amount of *Malassezia*.

In conclusion, we identified microorganisms that exacerbate the skin diseases AD, SD, and PV, and showed that our findings can be applied clinically.

Key words: atopic dermatitis, cutaneous microbiota, pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis.

緒 言

われわれの皮膚には様々な微生物が常在している。この皮膚常在菌は、皮膚の保湿、外部からの病原菌の侵入阻止、あるいは紫外線の吸収といったわれわれの健康維持に必要な機能を有する。しかしながら、何らかの原因で皮膚常在菌叢のバランスが破綻すると、様々な疾患に進展することがある (Roth & James, 1989)。アクネ菌は健康な皮膚の維持に必要な細菌で

あるが、毛包内で本菌が異常増殖すると炎症を引き起こす (Thiboutot, 2008)。脂漏性皮膚炎や癬風は、常在真菌である *Malassezia* が分解した皮脂の代謝産物で炎症が惹起される (Ashbee, 2007)。アトピー性皮膚炎患者では遺伝的に皮膚セラミドバリア機能が低下しているため、皮膚常在菌に対して特異 IgE 抗体が産生される (Baker, 2006)。

最も高頻度に定着している真菌は *Malassezia* である。本菌は好脂性酵母でありヒトあるいは哺乳類動物の皮膚に常在している。増殖に脂質を要求することから、ヒトでは脂腺の発達した頭頸部に多くの *Malassezia* を観察することができる。分類学的には

E-mail: sugita@my-pharm.ac.jp

Malassezia 属には13菌種が存在するが、そのうち9菌種はヒト由来であり、4菌種は動物由来である。本属菌種は、古くから脂漏性皮膚炎や癬風の原因と考えられており、近年ではアトピー性皮膚炎との関係が示唆されている (Ashbee, 2007)。我が国におけるアトピー性皮膚炎の有病率は7~10%にも達し1,000万人以上が罹患していることから、国民病的様相を呈している。

本研究では、アトピー性皮膚炎を対象疾患として、その皮膚常在菌の菌叢を明らかにし、それを制御することで疾患を克服することを試みた。

実験方法

非培養系によるアトピー性皮膚炎患者皮膚の *Malassezia* 叢の解析 アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 患者の皮疹部を OpSite™ を用いてストリッピングし、付着した真菌 DNA を直接抽出した。ヒト由来の9菌種 (*M. dermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtuse*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis*) の検出のための PCR primer を rRNA 遺伝子中の ITS (internal transcribed spacer) あるいは IGS (intergenic spacer) 領域上に設計し、nested PCR で各々の菌種 DNA を検出した。主要構成菌種については、IGS 領域上に TaqMan probe を設計し real-time PCR により定量を行った。*M. globosa* および *M. restricta* については、さらに遺伝子多型解析を行うため当該 PCR 産物 (IGS1 領域) を TA クローニングし、陽性クローンをシーケンス解析した。*M. caprae*, *M. equina*, *M. nana* および *M. pachydermatis* は動物由来菌種であるため、本研究の解析対象から除外した。また、脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis, SD)、癬風 (pityriasis versicolor, PV) および健康人 (healthy subject, HS) 皮膚も対照として用いた。なお、本試験は当該施設での倫理委員会の審議・承認後、各々の被験者から自由意志による参加の同意を取得した。

Malassezia 特異 IgE 抗体の測定 AlaSTAT™ を改変して各々の菌種特異的 IgE 抗体を測定した。すなわち、マイクロタイタープレートに抗原 (*M. dermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtuse*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*) を固相化し、それに患者血清を加えた。ペルオキシダーゼ標識抗 IgE 抗体と反応後、TMB で発色させ、吸光度を測定した。

薬剤感受性試験および Time Kill 法による評価 ヒト由来の *Malassezia* 9 菌種、124 株について

itraconazole (ITZ) および ketoconazole (KTZ) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を modified Leeming and Notman (mLNA) 培地を用いて測定した。MIC は 32℃, 7 日間倍後の増殖の有無により判定した。さらに、カルシニューリン阻害薬 tacrolimus (TCL) および pimecrolimus (PCL) についても同様に感受性を調べた。さらに ITZ について、 10^5 /ml の *M. globosa* および *M. restricta* 細胞に $1/4\times$, $1\times$, $2\times$, $4\times$, $8\times$ MIC 濃度の ITZ を加えて、経時的な CFU を測定することにより、*in vitro* での薬動学的検討を加えた。

ITZ および KTZ 投与による AD の治療効果 頭頸部に病変を有する成人 AD に ITZ カプセルを 100 mg/day を 4 週間、あるいは KTZ クリームを 4 週間投与し臨床的な改善効果と皮膚 *Malassezia* 量および抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体値を測定した。

結 果

Malassezia 関連皮膚疾患の菌叢解析 AD, SD, PV および HS の解析対象例数は、それぞれ31, 36, 36および30であった。いずれの疾患群および健康人群においても、*M. globosa* および *M. restricta* は全例から検出された。それ以外の7菌種の検出率は約10~60%であった。このことから、*Malassezia* は疾患にかかわらず *M. globosa* および *M. restricta* が主要構成菌種であることが示された (Fig. 1)。しかしながら、real-time PCR による定量から、これらの菌種の量比は疾患特異的であった (Fig. 2)。すなわち、SD では *M. restricta*, PV では *M. globosa* が優位であるが AD では両菌種が同等であった。また、1 症例あたりの平均検出数は、SD が 3.11 ± 1.73 , PV が 2.80 ± 1.27 , AD が 4.08 ± 1.88 , HS が 2.82 ± 0.83 であったことから、AD 患者が最も多様化していた (Fig. 3)。

M. globosa および *M. restricta* の遺伝子多型解析 IGS 領域は著しい種内多様性を示すことから疫学的な解析が可能となる。AD, SD 患者および HS 由来の *M. globosa* および *M. restricta* の IGS1 領域の DNA 塩基配列から分子系統樹を作成した。*M. globosa* IGS1 領域は8つのクラスターに大別された。このうち、クラスター II~VI は AD および SD 患者由来、クラスター I および VII は患者および HS 群、クラスター VII は HS 群から構成されていた (Fig. 4)。一方、*M. restricta* IGS1 領域は2つのクラスターに大別された。クラスター I は患者および HS 群、II は患者群であった (Fig. 5)。このことから、疾患特異的な菌株の存在が示唆された。

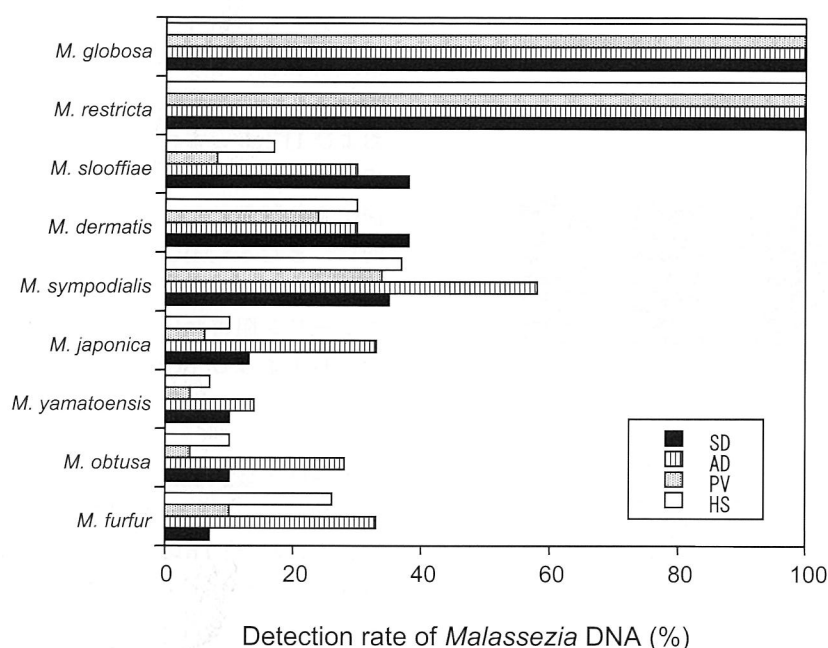


Fig. 1 Detection of *Malassezia* DNA in patients with AD, PV, and SD, and HSs. AD, atopic dermatitis; PV, pityriasis versicolor; SD, deborrhoec dermatitis. HS, healthy subject. AD, n=36; PV, n=49; SD, n=31; HS, n=30.

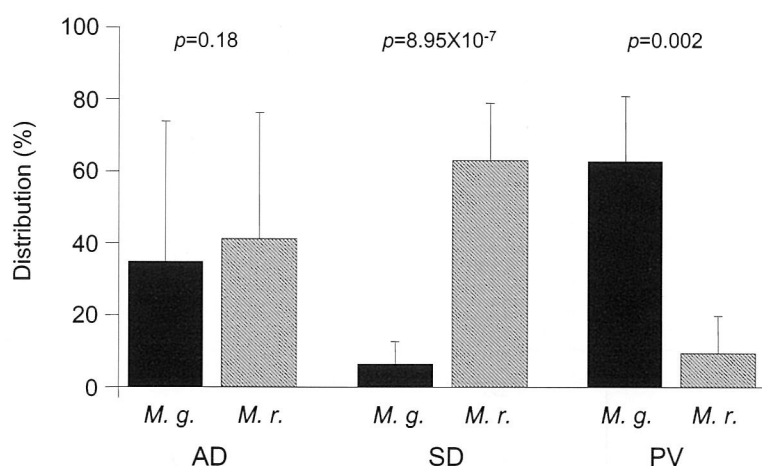


Fig. 2 The number of rDNA copies of *Malassezia* organisms in AD, PV, and SD patients by real-time PCR. *M. g.*; *M. globosa*; *M. r.*, *M. restricta*; AD, atopic dermatitis; PV, pityriasis versicolor; SD, deborrhoec dermatitis. Error bars show standard deviation. AD, n=36; PV, n=49; SD, n=31; HS, n=30.

しかしながら臨床症状とクラスター間に相関は認められなかった。

AD患者における抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体 ヒト由来の *Malassezia* 属菌種に対する特異 IgE 抗体測定系を構築した。 *M. restricta* に対する特異 IgE 抗体値が最も高く (Fig. 6), また competitive ELISA inhibition test

から本菌は他の菌種との共通抗原と菌種特異抗原を有していた (data not shown)。抗体産生の点からは *M. restricta* が最も AD の増悪に関与している可能性が示唆された。

薬剤感受性試験と time-kill 法による評価 AD患者にとって増悪微生物となる *Malassezia* を除菌するため

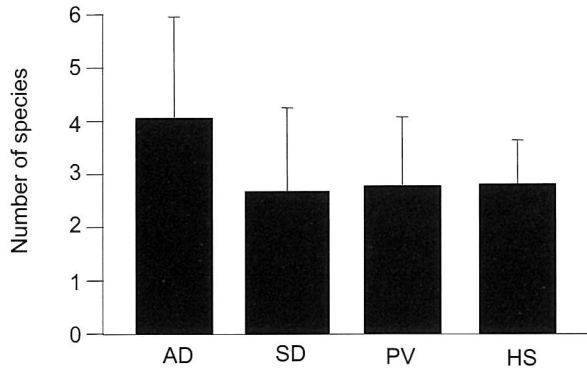


Fig. 3 The number of *Malassezia* species detected by nested PCR.

AD, atopic dermatitis; HS, healthy subject; PV, pityriasis versicolor; SD, seborrheic dermatitis. Error bars show standard deviation. AD, n=36; PV, n=49; SD, n=31; HS, n=30.

に、有効な抗真菌薬を選択した。KTZ および ITZ の MIC は菌種によりその値に差異がなかったため、全菌種の値として Table 1 に示した。約 90% の菌株は KTZ および ITZ のいずれに対しても、 $0.03\mu\text{g/ml}$ の低濃度で発育が阻止された。ITZ についてはさらに time kill 法により評価した。ITZ は $2\times\text{MIC}$ 以上の濃度で静菌的に、また $4\times\text{MIC}$ 以上で初期濃度以下に細胞数を減少させた (Fig. 7)。AD の標準的治療薬であるカルシニューリン阻害薬についても併せて抗真菌効果を検討した。TCL および PCL は $16\sim 64\mu\text{g/ml}$ と高値を示したが、抗 *Malassezia* 作用を有していた (Table 2)。

小児 AD と成人 AD 年齢が AD 患者の菌叢に及ぼす影響について更に検討した。解析を15歳以下（小児群，23例）と16歳以上（成人群，20例）に分け、*Malassezia* の菌量および特異 IgE 抗体値を測定した。成人の方が小児に比べて有意に菌量が多く (Fig. 8)，

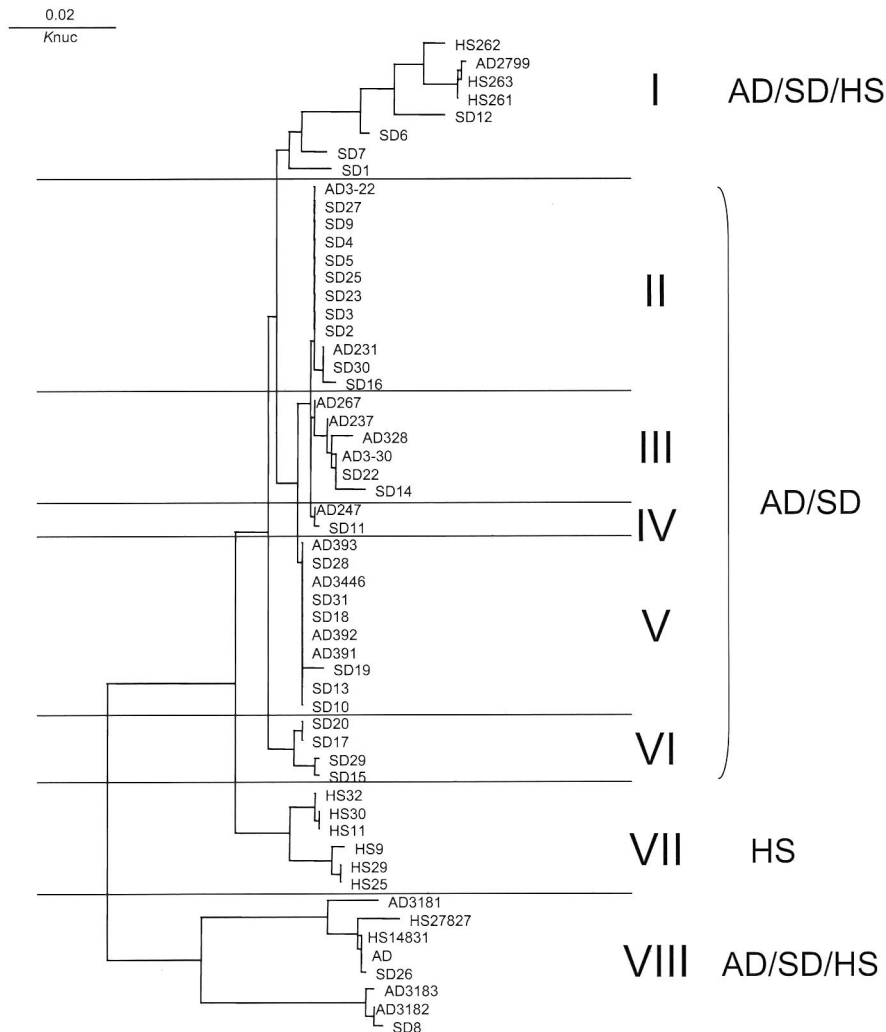


Fig. 4 Phylogenetic tree of *M. globosa*, based on DNA sequences of the IGS1 region. AD, atopic dermatitis; SD, seborrheic dermatitis; HS, healthy subject.

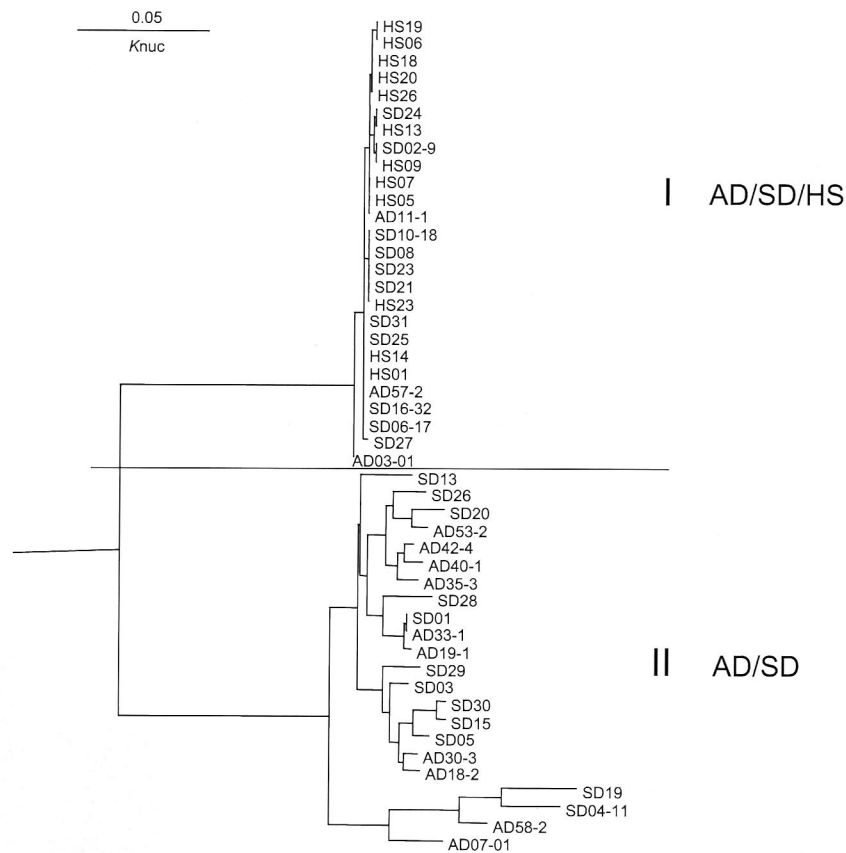


Fig. 5 Phylogenetic tree of *M. restricta*, based on DNA sequences of the IGS1 region. AD, atopic dermatitis; SD, seborrheic dermatitis; HS, healthy subject.

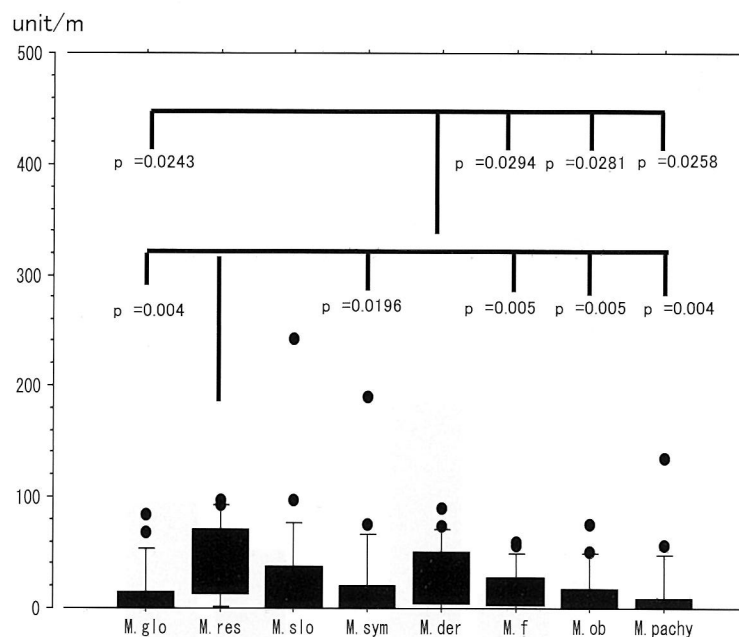


Fig. 6 The species-specific IgE values of eight *Malassezia* species in sera from AD patients determined using an ELISA method.

M. glo, *M. globosa*; M. res, *M. restricta*; M. slo, *M. slooffiae*; M. sym, *M. sympodialis*; M. der, *M. dermatitis*; M. f, *M. furfur*; M. ob, *M. obtusa*; M. pachy, *M. pachydermatis*.

Table 1 Antifungal susceptibilities of *Malassezia* strains to ketoconazole and itraconazole.

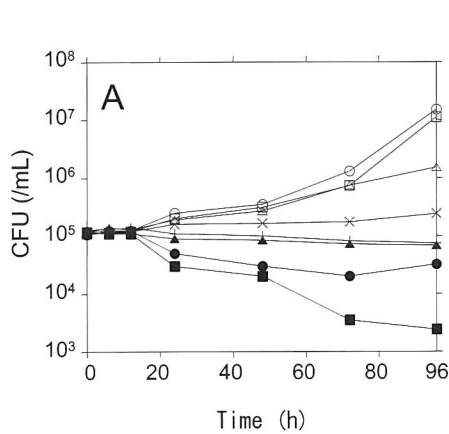
Agent	Cumulative % inhibited at the following MIC (μmL)				
	<0.03	0.03	0.06	0.125	0.25
Ketoconazole	76.6 (95)	88.7 (15)	95.2 (8)	100 (6)	0
Itraconazole	75.8 (94)	90.3 (18)	95.1 (6)	98.3 (4)	100 (2)

The number of strains examined is shown in parentheses.

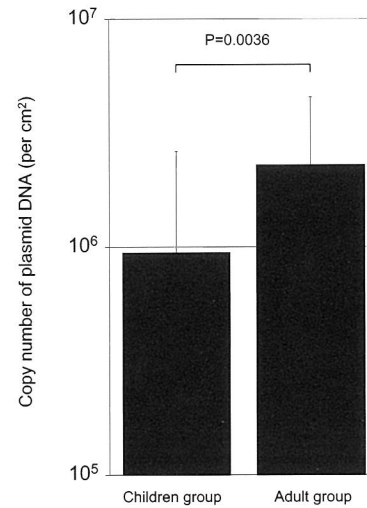
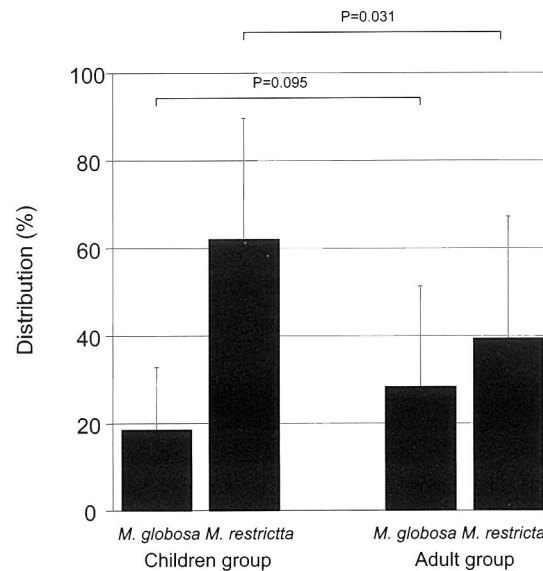
Table 2 Antifungal susceptibilities of *Malassezia* strains to tacrolimus and pimecrolimus

Agent	Cumulative % inhibited at the following MIC (μmL)		
	16	32	64
Tacrolimus	17.6 (22)	32.8 (41)	49.6 (62)
Pimecrolimus	41.6 (52)	48.0 (60)	10.4 (13)

The number of strains examined is shown in parentheses.

**Fig. 7** Time-kill curves for ITZ against *M. globosa*.

○, control; □, $1/4 \times \text{MIC}$; △, $1 \times \text{MIC}$; ×, $2 \times \text{MIC}$; +, $4 \times \text{MIC}$; ▲, $8 \times \text{MIC}$; ●, $16 \times \text{MIC}$; ■, $32 \times \text{MIC}$.
CFU, colony forming unit.

**Fig. 8** Amounts of all *Malassezia* in lesional skin of adults and children with atopic dermatitis. The plasmid copy number cm^{-2} is shown.**Fig. 9** Distributions of the two major species, *M. restricta* and *M. globosa*.

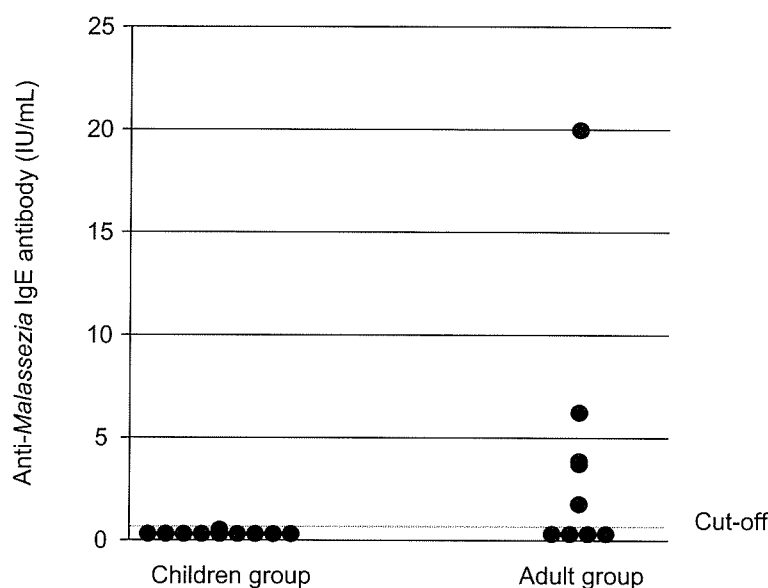


Fig. 10 Levels of specific IgE antibodies against *Malassezia* species in children and adults.

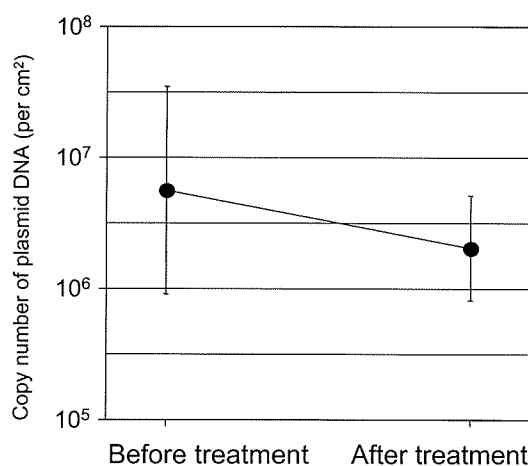


Fig. 11 Change of amount of *Malassezia* DNA in lesional skin of patients with atopic dermatitis after treatment of oral itraconazole.

また加齢に従って、主要構成菌種の量的比率も変化した (Fig. 9)。IgE 応答の点から加齢に伴い *Malassezia* に感作されることも示された (Fig. 10)。

AD に対するアゾール系抗真菌薬による臨床的効果
頭頸部に病変を有する成人 AD 患者に KTZ クリーム (12例) および ITZ カプセル (10例) を投与し治療効果を判定したところ、両薬剤群ともに約 70% の患者に改善が認められた。KTZ および ITZ 投与共に皮膚 *Malassezia* の除菌率は約 90% であり (Fig. 11)、これに伴い抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体値の低下も認められた。

考 察

本研究では、皮膚疾患の原因あるいは増悪因子となる皮膚常在微生物の菌叢を解明し、その結果を治療に応用することを試みた。皮膚常在真菌の中で *Malassezia* は最も優位であり、頭頸部にはおよそ 10³ CFU/cm² が定着している。特に、AD、SD および PV の関与が示唆されてきた (Ashbee, 2007)。これまでもこれらの疾患に関与する *Malassezia* を明らかにする目的で、培養法 (culture-dependent method) による菌叢解析が行われてきた (Nakabayashi *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001; Prohić, 2003; Salah *et al.*, 2005)。しかしながら、その解析結果は報告により大きく異なっている。これは、*Malassezia* は脂質要求性であり、分離に適した培地が開発されていないことに起因すると考えられる。そこで、著者らは培養を介さない nested PCR による非培養検出法 (culture-independent method) を開発してきた (Sugita *et al.*, 2001a)。これにより高感度かつ高精度に *Malassezia* 叢を解析することを可能とした。実際に、培養法では *M. globosa* や *M. restricta* はほとんど分離できない。AD 患者はドライスキンであり、SD 患者皮膚はオイリーであることから、疾患ごとに菌叢は異なると予想していたが、HS 群を含めていずれの疾患群でも菌叢はほぼ同一であった。しかしながら、主要構成菌種である *M. globosa* および *M. restricta* の量比は大きくことになった。このことから、SD では *M. restricta*、PV では *M. globosa*、AD では両菌種がその発症に重要な役割を演じていると考えられた。事実、

PV 患者の鱗屑を直接鏡頭すると菌糸型が観察される。これは、*M. globosa* は菌糸を形成するが *M. restricta* は形成しないことに一致する (data not shown)。

著者らはこれまでに、*Malassezia*, *Cryptococcus* や *Trichosporon* を用いた研究から真菌の rRNA 遺伝子中の IGS1 領域には著しい種内多様性が存在し、疫学的解析に供せることを明らかにしてきた (Sugita *et al.* 2001b, 2002, 2005)。本研究によっても AD および SD 患者に特異的な遺伝子型が存在することが明らかになった。データには示さないが患者特異株のアゾール薬に対する MIC は、健常人特異株よりもやや高かった。しかしながら、患者背景 (性別、重症度等) と遺伝子型には明確な相関は見出せなかった。理由は不明であるが、患者と健常人の皮脂組成により何らかの選択が生じた結果、遺伝子型に差異が生じたと考えている。

SD や PV の *Malassezia* 叢は明らかにされていないが、抗真菌薬や外用ステロイド薬でその症状は改善する。一方、AD については外用ステロイド薬やカルシニューリン阻害薬であるタクロリムスが標準的治療薬として用いられている。しかしながら、これらは抗炎症薬であり、根本的治療法とはならない。AD の原因は単一ではなく食物やストレス等の環境因子等が複合的に絡み合う。小児での罹患率は、10-20% にも達するが加齢とともにその率も減少してくるが、数% の患者は成人になっても治癒しない。一般に成人型 AD は難治化の傾向にある。本研究によっても小児 AD 患者では抗 *Malassezia* 抗体が産生されないことが判明した。そこで、次に成人型 AD 患者を対象として皮膚 *Malassezia* の除菌療法を試みた。In vitro では ITZ および KTZ は全 *Malassezia* 菌種に対して優れた感受性を示した。経口薬として ITZ、外用薬として KTZ を投与したが、標準的治療法に不応答の患者の約 70% に改善が認められた。症状の改善とともに皮膚 *Malassezia* 量も約 90% 減少した。抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体が減少しダニ抗体値が不変であったことから、*Malassezia* が AD の増悪因子であることは明らかである。一方で、皮膚の *Malassezia* を選択的に除菌した場合、他の常在細菌叢に影響を及ぼす。効果的な抗真菌薬の投与方法を設定と *Malassezia* の除菌が適用となる診断法の開発は今後の課題である。抗真菌薬は抗炎症薬ではないため、外用ステロイド薬やカルシニューリン阻害薬は併用することになる。本研究では、カルシニューリン阻害薬に抗 *Malassezia* 効果を有することも明らかにした。MIC はアゾール薬に比べれば高値を示したが、カルシニューリン阻害薬の MIC は臨床濃度を超えていた。このことは、カルシニューリン阻害薬は主作用である免疫抑制作用に加えて抗 *Malassezia* 効

果も病変の改善に寄与している可能性が示唆された。

研究途中であるためデータには示さないが、皮膚には 100 菌種以上の細菌が存在することも明らかになった。これらの皮膚常在菌が相互作用しながらバリア機能を維持している。本研究は、増悪微生物を制御することで、疾患の克服が可能であることをアトピー性皮膚炎を例に示した。今後は皮膚常在菌のバランスを制御することにより健康な皮膚の維持、ひいては疾病の予防へと研究を展開したいと考えている。

要 約

本研究では、皮膚常在菌である *Malassezia* の関与が示唆されている AD、SD および PV の菌叢を非培養法により高精度に解析した。いずれの疾患においても菌叢はほぼ同一であったが、主要構成菌種である *M. globosa* と *M. restricta* の量比が疾患特異的であった。In vitro 薬剤感受性試験の結果から、*Malassezia* の除菌に有効な抗真菌薬として ITZ と KTZ が選択された。成人型頭頸部 AD 患者を対象として ITZ および KTZ を用いた皮膚 *Malassezia* の除菌療法を試みたところ約 70% の患者に、皮膚 *Malassezia* 量および抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体の減少とともに症状の改善が認められた。以上、本研究では皮膚常在菌の制御により疾患の克服が可能であることを、菌叢解析と臨床試験により明らかにした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Tsubuku, H., Sugita, T., Kato, H., Nishikawa, A. & Tsuboi, R. (2006). Effect of oral itraconazole on the clinical manifestations and population of *Malassezia* in intractable atopic dermatitis. 16th Congress of the International of Human and Animal Mycology, Paris, France.
- 2) Tajima, M., Sugita, T., Ito, T., Nishikawa, A. & Tsuboi, R. (2006). Real-time PCR identification of *Malassezia* spp. and measurement of *Malassezia*-specific serum IgE antibody in antimycotic-treated atopic dermatitis patients. 16th Congress of the International of Human and Animal Mycology, Paris, France.
- 3) Harada, S., Sugita, T., Tajima, M., Tsubuku, H., Tsuboi, R. & Nishikawa, A. (2006). Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in a patient with atopic dermatitis using real-time PCR with a TaqMan probe. 16th Congress of the International of Human and Animal Mycology, Paris, France.
- 4) Nishikawa, A., Ishibashi, Y., Asahi, Y., Sugita, T. & Kato, H. (2006). Major allergen components of *Malassezia globosa* in patients with atopic dermatitis. 16th Congress

- of the International of Human and Animal Mycology, Paris, France.
- 5) 田嶋磨美, 杉田隆, 伊藤友章, 坪井良治 (2005). アトピー性皮膚炎に対するケトコナゾール外用の臨床的効果と *Malassezia* 菌量の変化. 第104回日本皮膚科学会総会 横浜.
 - 6) 津福久恵, 杉田隆, 田嶋磨美, 坪井良治 (2005). *Malassezia* に対するタクロリムスの抗真菌作用と特異抗原遺伝子発現制御. 第30回日本研究皮膚科学会年次学術大会 横浜.
 - 7) 津福久恵, 杉田隆, 田嶋磨美, 山崎正視, 西川朱實, 坪井良治 (2005). *Malassezia* に対するアゾール系抗真菌薬とタクロリムスの新規作用－薬剤感受性相乗作用とアレルゲン遺伝子抑制作用－. 第26回関東医真菌懇話会 東京.
 - 8) 杉田隆 (2005). 特別講演 マラセチアと皮膚疾患. 第56回神奈川医真菌懇話会 横浜.
 - 9) 杉田隆 (2005). 特別講演 マラセチアと皮膚疾患－マラセチアをめぐる最近のトピックス－. 第26回北陸医真菌懇話会 金沢.
 - 10) 杉田隆, 田嶋磨美, 津福久恵, 坪井良治, 加藤博司, 原田聡, 西川朱實, 梶本明香, 白神博 (2005). アトピー性皮膚炎患者皮膚の微生物叢の解析と治療への応用. 第17回微生物シンポジウム 東京.
 - 11) 田嶋磨美, 杉田隆, 伊藤友章, 加藤博司, 西川朱實, 坪井良治 (2005). 頭頸部難治性アトピー性皮膚炎患者へのケトコナゾールクリーム外用による *Malassezia* の菌量と臨床効果および血中 IgE 抗体価の推移. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 12) 津福久恵, 杉田隆, 加藤博司, 西川朱實, 坪井良治 (2005). アトピー性皮膚炎に対するイトラコナゾールの臨床効果とタクロリムスの新規作用. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 13) 杉田隆, 田嶋磨美, 津福久恵, 坪井良治, 西川朱實, 梶本明香, 白神博 (2005). アトピー性皮膚炎患者皮膚に常在する微生物叢の rDNA クローンライブラリー法を用いた網羅的解析. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 14) 加藤博司, 杉田隆, 西川朱實 (2005). 成人のアトピー性皮膚炎患者の皮膚に常在する *Cryptococcus diffluens*, *C. liquefaciens* 特異的 IgE 抗体の検討. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 15) 石橋芳雄, 加藤博司, 杉田隆, 西川朱實 (2005). アトピー性皮膚炎に関連する *Malassezia* 特異抗原の解析. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 16) 杉田隆 (2005). アトピー性皮膚炎と *Malassezia* -最近の基礎研究の進歩-. 第49回日本医真菌学会総会 千葉.
 - 17) 杉田隆 (2006). アトピー性皮膚炎と *Malassezia*. 第69回日本皮膚科学会東京支部 横浜.
 - 18) 原田聡, 杉田隆 (2006). 16S クローンライブラリー法を用いたアトピー性皮膚炎患者の皮膚細菌叢の網羅的解析. 日本薬学会第126年会 仙台.
 - 19) 杉田隆, 西川朱實 (2006). 皮膚常在微生物の制御に基づくアトピー性皮膚炎の治療. 日本薬学会第126年会 仙台.
 - 20) 田嶋磨美, 杉田隆, 伊藤友章, 西川朱實, 坪井良治 (2006). アトピー性皮膚炎に対するケトコナゾールの効果. 第31回日本研究皮膚科学会年次学術大会 京都.
 - 21) 津福久恵, 杉田隆, 加藤博司, 西川朱實, 坪井良治 (2006). アトピー性皮膚炎に対するイトラコナゾールの臨床効果. 第105回日本皮膚科学会総会 京都.
 - 22) 杉田隆 (2006). 皮膚真菌の定量化の意義. 第14回医真菌学セミナー 東京.
 - 23) 津福久恵, 杉田隆, 坪井良治 (2006). 尋常性ざ瘡の病態に及ぼす *Malassezia* の関与の検討. 第14回医真菌学セミナー 東京.
 - 24) 津福久恵, 杉田隆, 坪井良治 (2006). 尋常性ざ瘡の病態に及ぼす *Malassezia* の関与の検討. 第24回日本美容皮膚科学会・学術大会 東京.
 - 25) 田嶋磨美, 杉田隆, 原田聡, 西川朱實, 坪井良治 (2006). *Megasort*® を用いた *Malassezia* 菌糸特異遺伝子検出の試み. 第50回日本医真菌学会総会 東京.
 - 26) 原田聡, 杉田隆, 田嶋磨美, 津福久恵, 坪井良治, 西川朱實 (2006). ステロイドおよびタクロリムスが *Malassezia* の分泌性リパーゼ産生に及ぼす影響. 第50回日本医真菌学会総会 東京.
 - 27) 石橋芳雄, 杉田隆, 西川朱實 (2006). マラセチアとアトピー性皮膚炎－ヒトケラチノサイトのサイトカイン応答－. 第50回日本医真菌学会総会 東京.
 - 28) 津福久恵, 杉田隆, 坪井良治 (2006). 尋常性ざ瘡の病態に及ぼす *Malassezia* の関与の検討. 第50回日本医真菌学会総会 東京.
 - 29) 高畑ゆみ子, 杉田隆, 比留間政太郎, 武藤正彦 (2006). 乾癬患者における real-time PCR を用いた *Malassezia* の定量解析. 第50回日本医真菌学会総会 東京.
 - 30) 杉田隆 (2007). 教育講演「*Malassezia* と各種皮膚疾患」. 日本医真菌学会50周年記念シンポジウム 東京.
 - 31) 杉田隆 (2007). シンポジウム「*Malassezia* と脂漏性皮膚炎」. 第70回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京.
 - 32) 杉田隆, 原田聡, 西川朱實 (2007). アトピー性皮膚炎治療薬としてのステロイドおよびタクロリムスが酵母 *Malassezia* に与える影響. 日本薬学会第127年会 富山.
 - 33) 高畑ゆみ子, 杉田隆, 比留間政太郎, 武藤正彦 (2007). 乾癬患者における real-time PCR を用いた *Malassezia* の定量解析. 日本研究皮膚科学会第32回年次学術大会 京都.
 - 34) 杉田隆 (2007). 教育セミナー「アトピー性皮膚炎と皮膚常在菌」. 第57回日本アレルギー学会学術大会 横浜.
 - 35) 加藤博司, 杉田隆, 石橋芳雄, 西川朱實 (2007). ヒトの皮膚に常在する *Malassezia* 7 菌種の特異的 IgE 抗体の検討. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜.
 - 36) 石橋芳雄, 加藤博司, 杉田隆, 西川朱實 (2007). アトピー性皮膚炎に関連する *Malassezia restricta* 特異抗原の解析. 第51回日本医真菌学会総会 岐阜.
 - 37) 加藤博司, 杉田隆, 石橋芳雄, 西川朱實, 高畑ゆみ子, 武藤正彦, 比留間政太郎 (2007). アトピー性皮膚炎患者における, *Malassezia globosa*, *M. restricta* 特異的 IgG および IgA 抗体の検討. 第51回日本医真菌学会総会 岐阜.
- 原著論文
- 1) Sugita, T., Tajima, M., Tsubuku, H., Tsuboi, R. & Nishikawa, A. (2006). A new calcineurin inhibitor, pimecrolimus, inhibits the growth of *Malassezia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2897-2898.

- 2) Sugita, T., Tajima, M., Tsubuku, H., Tsuboi, R. & Nishikawa, A. (2006). Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol. Immunol.* **50**: 549-552.
- 3) Sugita, T., Tsubuku, H., Tajima, M., Tsuboi, R. & Nishikawa, A. (2006). Time-kill assay of itraconazole against *Malassezia* species. *Microbiol. Immunol.* **50**: 625-627.
- 4) Morishita, N., Sei, Y. & Sugita, T. (2006). Molecular analysis of malassezia microflora from patients with pityriasis versicolor. *Mycopathologia* **161**: 61-65.
- 5) Ishibashi, Y., Sugita, T. & Nishikawa, A. (2006). Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **48**: 400-409.
- 6) Kato, H., Sugita, T., Ishibashi, Y. & Nishikawa, A. (2006). Detecting species-specific *Malassezia* IgE antibody in the serum of patients with atopic dermatitis using an ELISA method. *Microbiol. Immunol.* **50**: 851-856.
- 7) Takahata, Y., Sugita, T., Hiruma, M. & Muto, K. (2007). Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of patients with psoriasis using a real-time PCR assay. *Br. J. Dermatol.* **157**: 670-673.
- 8) Amaya, M., Tajima, M., Okubo, Y., Sugita, T., Nishikawa, A. & Tsuboi, R. (2007). Molecular analysis of *Malassezia* microflora in the lesional skin of psoriasis patients. *J. Dermatol. Sci.* **34**: 619-624.
- 9) Kato, H., Sugita, T., Ishibashi, Y. & Nishikawa, A. (2007). Evaluation of the levels of specific IgE against *Cryptococcus diffluens* and *Cryptococcus liquefaciens* in patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol.* **51**: 945-950.
- 10) Takahata, Y., Sugita, T., Kato, H., Nishikawa, A., Hiruma, M. & Muto, M. (2007). Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br. J. Dermatol.* **157**: 1178-1182.
- 11) Tajima, M., Sugita, T., Nishikawa, A. & Tsuboi, R. (2008). Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J. Inv. Dermatol.* **128**: 614-625.

保存機関に寄託した菌株

Malassezia sp. M 11001 (=NBRC 101593)
Malassezia sp. M 11002 (=NBRC 101594)
Malassezia sp. M 11003 (=NBRC 101595)
Malassezia sp. M 11004 (=NBRC 101596)
Malassezia sp. M 11005 (=NBRC 101597)
Malassezia sp. M 11006 (=NBRC 101598)
Malassezia sp. M 11007 (=NBRC 101599)
Malassezia sp. M 11008 (=NBRC 101600)
Malassezia sp. M 11009 (=NBRC 101601)
Malassezia sp. M 11010 (=NBRC 101602)
Malassezia sp. M 11011 (=NBRC 101603)

Malassezia sp. M 11012 (=NBRC 101604)
Malassezia sp. M 11013 (=NBRC 101605)
Malassezia sp. M 11014 (=NBRC 101606)
Malassezia sp. M 11015 (=NBRC 101607)
Malassezia sp. M 11016 (=NBRC 101608)
Malassezia sp. M 11017 (=NBRC 101609)
Malassezia sp. M 11018 (=NBRC 101610)

謝 辞

本研究の多くは財団法人醗酵研究所の研究助成により実施されたものです。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたって御指導・御協力頂きました明治薬科大学免疫生物学教室教授西川朱實先生，同大学微生物学教室教授池田玲子先生，同大学免疫生物学教室准教授石橋良雄先生，同研究員加藤博司先生，東京医科大学皮膚科学教室教授坪井良治先生，同教室助教田嶋磨美先生，自衛隊中央病院皮膚科津福久恵先生（現自衛隊福岡病院），順天堂大学練馬病院皮膚アレルギー科教授比留間政太郎先生，山口大学医学部皮膚科学教室高畑ゆみ子先生，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高島昌子先生に深謝致します。また，研究期間中には東京農業大学客員教授/製品評価技術基盤機構顧問中瀬崇先生に激励を頂きました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- Ashbee, H. R. (2007). Update on the genus *Malassezia*. *Med. Mycol.* **45**: 287-303.
 Ayadi, A. (2005). Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses.* **48**: 242-245.
 Baker, B. S. (2006). The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **144**: 1-9.
 Gupta, A. K., Kohli, Y., Summerbell, R. C. & Faergemann, J. (2001). Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med. Mycol.* **39**: 243-251.
 Gupta, A. K., Kohli, Y., Faergemann, J. & Summerbell, R. C. (2001). Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med. Mycol.* **39**: 199-206.
 Nakabayashi, A., Sei, Y. & Guillot, J. (2000). Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med. Mycol.* **38**: 337-341.
 Prohić, A. (2003). Identification of *Malassezia* species isolated from scalp skin of patients with psoriasis and healthy subjects. *Acta. Dermatovenereol. Croat.* **11**: 10-16.

- Roth, R. R. & James, W. D. (1989). Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **20**: 367-390.
- Salah, S. B., Makni, F., Marrakchi, S., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Bouassida, S., Zahaf, A & Ayadi A. (2005). Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses.* **48**: 242-245.
- Sugita, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H., Shinoda, T & Nishikawa, A. (2001a). Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3486-3490.
- Sugita, T., Ikeda, R. & Shinoda, T. (2001b). Diversity among strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* as revealed by a sequence analysis of multiple genes and a chemotype analysis of capsular polysaccharide. *Microbiol. Immunol.* **45**: 757-768.
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T & Shinoda, T. (2002). Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1826-1830.
- Sugita, T., Takeo, K., Hama, K., Virtudazo, E., Takashima, M., Nishikawa, A., Kucsera, J., Dorogi, J., Komori, S., Nakagaki, K., Vollekova, A., Slavikova, E & Farkas, V. (2005). DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med. Mycol.* **43**: 21-26.
- Thiboutot, D. M. (2008). Overview of acne and its treatment. *Cutis.* **81**: 3-7.

優れた生分解性共重合ポリエステルを高効率生産する 微生物の分子育種

福 居 俊 昭

東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻

〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259 B-37

Molecular breeding of PHA-producing bacteria for efficient production of superior copolyesters

Toshiaki Fukui

Department of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology,
Tokyo Institute of Technology, B-37 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

As bacterial polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable thermoplastics, they have drawn increased attention as possible alternatives for petroleum-based polymers. This study focused on microbial production of random copolyesters of 3-hydroxyalkanoates having superior physical properties from biomass. We replaced chromosomal PHA synthase gene of *Cupriavidus necator* H16 with *phaC_{Ac}*, encoding PHA synthase with a broad substrate specificity, by homologous recombination. The resulting strain H16C_{Ac} actually grew on soybean oil and accumulated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolyester better than previous recombinant strains, although 3HHx fraction within the polymer chain decreased. Next, to synthesize poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) [P(3HB-co-3HP)] from single biomass, we modified the metabolic pathway in P(3HB)-producing cells for generation of 3HP-CoA from acetyl-CoA by applying malonyl-CoA reductase and 3HP-CoA synthetase, originally functioning in novel CO₂ fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*. *C. necator* wild strains H16 and JMP134 harboring these exogenous genes successfully synthesize P(3HB-co-3HP) copolyester from fructose with 1-2 mol% of 3HP fraction. These results demonstrate the potential of engineered metabolic pathways for production of copolyesters having favorable characteristics from inexpensive carbon resources.

Key words: Biodegradable plastic, Biomass plastic, Polyhydroxyalkanoate, Microbial production

緒 言

20世紀初頭に幕開けしたプラスチック産業は石炭化学・石油化学とともに大きく発展し、安価に大量生産されるプラスチック製品は我々の生活と産業活動に欠かせないものとなっている。しかし石油から合成されるプラスチックのほとんどは自然環境の中で分解されないために、その廃棄処理や環境流出が大きな問題となっている。また、主要な温室効果ガスの1つである二酸化炭素の排出量を削減するためには社会構造全体を化石資源に依存しないように変革していくことが必要であり、石油を原料としない素材の開発と実用化が

急務である。このような観点から、石油に依存せず、かつ自然界で分解されるプラスチック材料の開発が望まれている（木村&小原，2007；生分解性プラスチック研究会，2006）。

微生物の中にはエネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を合成し蓄積するものが数多く知られている。このポリエステルは環境中の微生物によって容易に分解・資化される生分解性プラスチックであるうえに、生産原料として糖や植物油などのカーボンニュートラルなバイオマス資源を利用できる。すなわちPHAはFig. 1に示すように地球の炭素サイクルに組み込まれるプラスチックであり、石油合成プラスチックの代替として期待されている素材の1つである（福居，2002）。

ポリ（（*R*）-3-ヒドロキシブタン酸）[P(3HB)]は（*R*）-

E-mail: tfukui@bio.titech.ac.jp

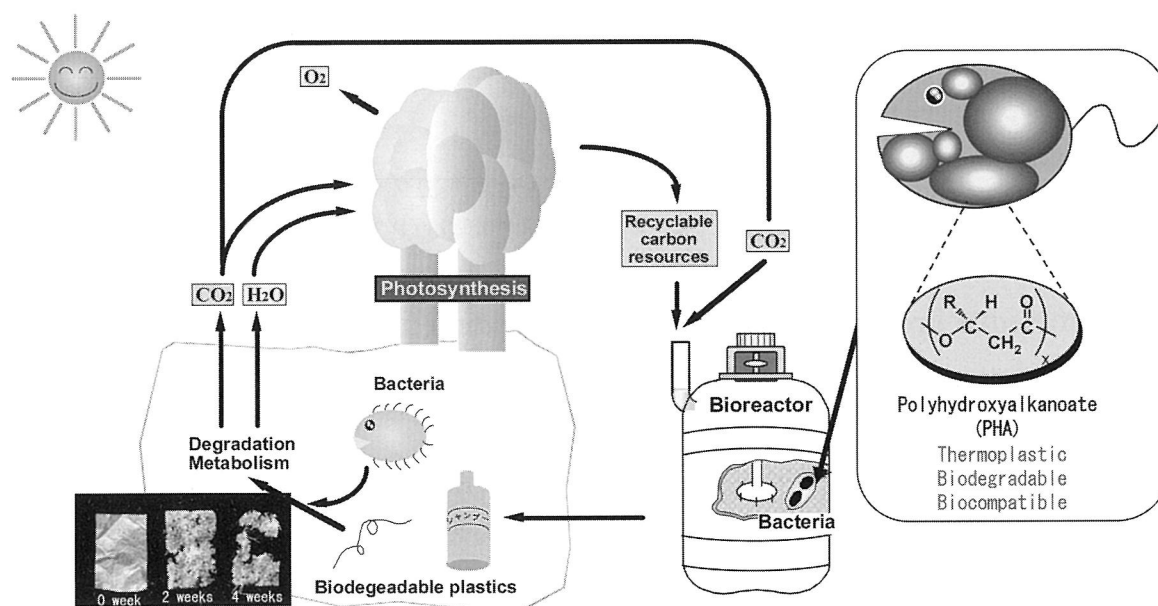


Fig. 1 Carbon cycle of bacterial polyhydroxyalkanoates as biodegradable biomass plastics.

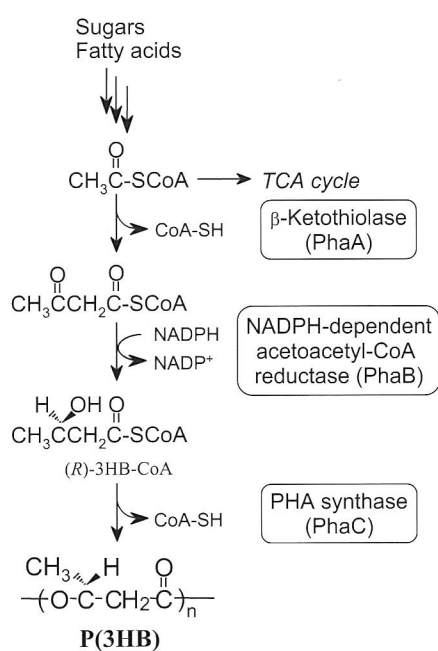


Fig. 2 P(3HB) biosynthesis pathway in *Cupriavidus necator*.

体の3-ヒドロキシブタン酸をモノマーとする光学活性ポリマーであり、水素細菌 *Cupriavidus necator* (旧名 *Wauterisia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* など) をはじめとする多くの細菌が生合成する代表的な PHA である (Fig. 2)。P(3HB) は溶融成形

が可能な熱可塑性高分子材料であるが、破壊伸びが約5%と小さく脆性を示すことなどから、材料としての実用化が困難である。1980年代に、微生物に与える炭素源を工夫することによって複数のモノマーユニットがランダムに重合した共重合体を微生物合成できることが見いだされた。共重合体では融点・結晶化度が低下して柔軟性が向上することや、共重合組成による物性制御が可能であることから関心を集めてきたが (Madison & Huisman, 1999; Philip *et al.*, 2007), その実用化のためには物性の優れた共重合体を安価な原料から低コストで生産する技術の確立が必須である。

PHA 生産微生物においては、外界の炭素源を細胞内に取り込むトランスポーター、そして取り込んだ炭素源をヒドロキシアシル-CoAへと変換するモノマー供給系が機能しており、そしてそのヒドロキシアシル-CoAが直接のモノマーとなってPHAシンターゼ(重合酵素)の作用により高分子鎖へと重合される。すなわち、どのような共重合体が生合成されるかは、その細胞が有するモノマー供給能力と重合酵素の基質特異性によって決定される。逆に言えば、遺伝子操作によって適切なモノマー供給経路と重合酵素を機能させれば、バイオマスのみから望みの共重合体を生合成することが可能になると考えられる。そこで本研究ではPHA生産菌の遺伝子操作によって、バイオマスのみを単一原料として共重合ポリエステルを効率的に生合成する株の育種を目的とした。

実験方法

菌株およびプラスミド PHA 生産用組換え微生物を作製するための宿主として *C. necator* 野生株である H16 (DSM428), JMP134 株 (DSM4058), H16 株に由来する PHA 合成能欠損株 PHB⁻4 株 (DSM541) を用いた。各種の遺伝子操作には汎用プラスミド pUC118 および *Escherichia coli* DH5 α 株を用いた。*C. necator* の形質転換には伝達性広宿主域ベクターである pBBR1-MCS2 を、相同性組換えには伝達性相同性組換え用プラスミド pK18mobSacB を利用し、接合伝達における DNA 供与体用の宿主として *E. coli* S17-1 株 (Simon *et al.*, 1983) を用いた。

培養 *E. coli* 株は LB 培地を用いて 37℃ で培養し、*C. necator* 株は栄養培地 (NR 培地: 10 g/l 肉エキス, 10 g/l ポリペプトン, 2 g/l 酵母エキス) を用いて 30℃ で培養した。*C. necator* 株の一段培養による PHA 生産は窒素制限無機塩培地 (MB 培地: 9 g/l Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.5 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l NH₄Cl, 0.2 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 1 ml/l 微量金属溶液 (Kato *et al.*, 1996)) に各種炭素源を添加した培地中、30℃ で 72 時間振とう培養することにより行った。二段培養による PHA 生産は NR 培地で 30℃, 24 時間振とう培養した後に遠心分離で回収した菌体を、窒素源 (NH₄Cl) を含まない MB 培地に懸濁して 30℃ で 48 時間振とうすることにより行った。炭素源をフルクトースやオクタン酸とする場合には、所定量のフィルター滅菌した高濃度溶液をオートクレーブ滅菌した培地に添加した。炭素源を大豆油とする場合では、そのまま所定量を添加した。必要に応じてアンピシリン (50 mg/l) またはカナマイシン (*E. coli* 株では 50 mg/l, *C. necator* 株では 200 mg/l) を加えた。

PHA の分析 PHA を蓄積した微生物細胞は遠心分離による集菌、脱イオン水による洗浄の後に凍結乾燥し、乾燥菌体重量を算出した。菌体内 PHA の組成および含量は、乾燥菌体 10~40 mg を密閉試験管内で加メタノール分解を行った後、生成した 3-ヒドロキシアリカン酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより同定および定量した。内部標準としてオクタン酸メチルを用いた (Kato *et al.*, 1996)。また凍結乾燥菌体をクロロホルム中、室温で 48 時間攪拌することにより菌体内 PHA を抽出し、メタノール再沈により精製した。精製 PHA は ¹H-NMR による構造解析を行った (Doi *et al.*, 1995)。

遺伝子操作 *E. coli* を宿主とした組換えプラスミドの作製は通常の手法により行った (Sambrook & Russell, 2001)。広宿主域ベクターの接合伝達による *C. necator* の形質転換は、伝達性プラスミドで形質転換した *E. coli* S17-1 株を供与体、*C. necator* を受容体としてニトロセルロースフィルター上で接合させることにより行った。フィルターを洗浄した菌体混合液から 200 mg/l カナマイシンを含む Simon's citrate agar 固体培地 (Difco) で *C. necator* 形質転換体を選抜した。*C. necator* の相同性組換えは pK18mobSacB 由来の組換えベクターを保持する *E. coli* S17-1 株を用いた接合伝達後にカナマイシン耐性を指標にベクターが染色体に挿入された株を選抜し、次いで 10% スクロースを含む栄養培地で培養することによって *sacB* を含むベクター由来領域が脱離した株を単離した。この単離株から目的の組換えが生じた株を PCR 解析によって選抜した。

酵素活性測定 *C. necator* 株は 0.5% フルクトースを含む MB 培地で 30℃, 36 時間振とう培養し、集菌後に超音波破碎した。その後、1500 g の低速遠心で未破碎細胞等を除去した画分を PHA 顆粒画分として PHA シンターゼ活性測定に供した。PHA 顆粒画分からさらに 12,000 g の高速遠心で可溶性タンパク質画分を調整し、 β -ケトチオラーゼ活性およびアセトアセチル-CoA レダクターゼ活性を測定した。PHA シンターゼ活性は (R)-3HB-CoA を基質とし、重合反応に伴う遊離 CoA-SH の生成速度を DTNB 法により定量した (Valentin & Steinbuchel, 1994)。 β -ケトチオラーゼ活性はアセトアセチル-CoA の開裂反応に伴うアセトアセチル-CoA-Mg²⁺ 錯体の減少速度を 304 nm における吸光度変化により求めた (Slater *et al.*, 1998)。アセトアセチル-CoA レダクターゼ活性はアセトアセチル-CoA の還元に伴う NADH または NADPH の減少を 340 nm における吸光度変化として測定した (Haywood *et al.*, 1988)。

結 果

植物油を原料としたポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸) 共重合体 [P(3HB-co-3HHx)] の微生物合成

筆者らはこれまでに、柔軟性に優れた P(3HB-co-3HHx) を生産する *Aeromonas caviae* より、炭素数 4 から 6 の 3-ヒドロキシアシル-CoA を基質とできる PHA シンターゼの遺伝子 *phaC_{Ac}* や、脂肪酸 β -酸化系を経由してモノマーを供給する新規酵素 (R)-特異的エノイル-CoA ヒドラターゼの遺伝子 *phaJ_{Ac}* をクローニングした

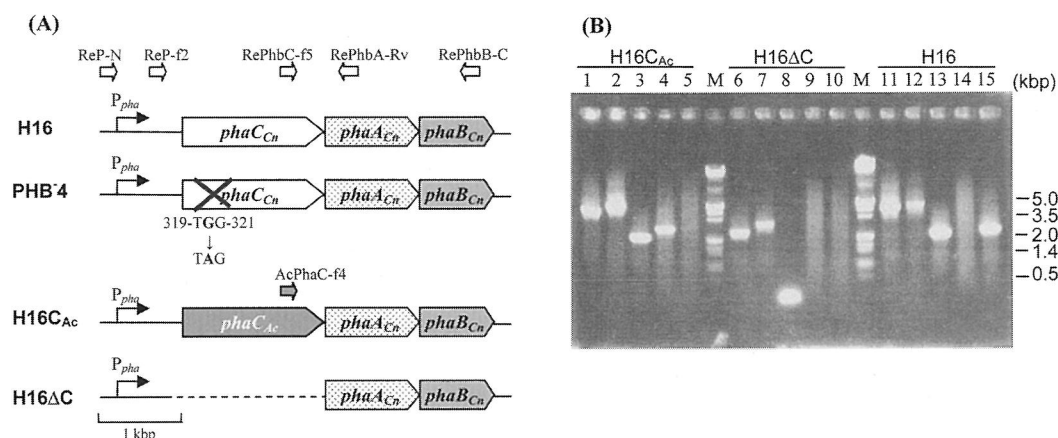


Fig. 3 (A) Schematic diagram of genotypes of *C. necator* strains used in this study. Small arrows indicate primers for PCR as below. (B) PCR analysis of recombinant strains of *C. necator* H16C_{Ac} (lanes 1-5), H16ΔC (6-10), and wild strain H16 (11-15) using primer sets of ReP-f2/RePhbB-C (lanes 1, 6, 11), ReP-N/RePhbB-C (2, 7, 12), ReP-f2/RePhbA-Rv (3, 8, 13), AcPhaC-f4/RePhbB-C (4, 9, 14), and RePhbC-f5/RePhbB-C (5, 10, 15). Lane M; molecular mass standard (λ DNA digested with EcoRI and HindIII).

Table 1 Enzyme activities in *C. necator* strains^a

Strain	PHA synthase (U/g) ^b	β -Ketothiolase (U/g) ^c	3-Ketoacyl-CoA reductase (U/g) ^d	
			NADH	NADPH
H16	715	3677	664	649
PHB ⁻ 4	1 (2272)	148	726	40
H16C _{Ac}	177	3723	707	662
H16ΔC	2 (546)	986	746	705

^aCells were cultivated for 36 h at 30°C in an MB medium containing 0.5% (w/v) fructose as a sole carbon source.

^bPolymerization activity for (R)-3HB-CoA. The activities in PHB⁻4 and H16ΔC harboring pJRDEE32d13 were shown in parentheses.

^cCleavage activity for acetoacetyl-CoA to acetyl-CoA.

^dNAD(P)H-dependent reduction activity for acetoacetyl-CoA.

(Fukui & Doi, 1997; Fukui *et al.*, 1998; 2001). さらに *C. necator* の PHA 合成能欠損株 PHB⁻4 株に *phaC_{Ac}* 遺伝子を導入した PHB⁻4/pJRDEE32d13 株が、パーム油やオリーブ油から P(3HB-co-3HHx) を効率よく合成 (乾燥菌体重量あたり約 80%) することを示した (Fukui & Doi, 1998). しかし、PHB⁻4 株を宿主とした組換え株は、野生株と比較すると増殖能や PHA 蓄積能が低下していた。この理由の一つに変異誘導のために施した変異源処理の影響が考えられたため、変異源処理によらずに染色体上の遺伝子を持異的に操作することで、効率よく P(3HB-co-3HHx) を生合成する株の作製を目指した。

C. necator H16 株 (野生株) の染色体では、P(3HB) のモノマーとなる 3HB-CoA を供給する β -ケトチオラーゼ遺伝子 (*phaA*) および NADPH-アセトアセチル-

CoA レダクターゼ遺伝子 (*phaB*) と、重合酵素である PHA シンターゼ遺伝子 (*phaC*) が *phaC-A-B* の順で配置したオペロンを構成している。PHB⁻4 株は PHA シンターゼの欠失により PHA 合成能が欠損していることがわかっているが、この *pha* オペロン中にどのような変異が生じているかは明らかにされていない。そこで、PHB⁻4 株の *pha* オペロン領域について塩基配列を決定したところ、*phaC_{cn}* の 320 位の G が A に置換されることで Trp をコードするコドンが終止コドンとなるナンセンス変異のみが見いだされた (Fig. 3A)。酵素活性測定の結果 (Table 1)、PHB⁻4 株では確かに PHA シンターゼの活性が失われていたが、加えて β -ケトチオラーゼや NADPH-アセトアセチル-CoA レダクターゼについても野生株と比べて顕著に活性が低下していた。上流領域や *phaAB_{cn}* 領域には変異は全く見いださ

Table 2 P(3HB) and P(3HB-co-3HHx) biosynthesis by wild and recombinant strains of *C. necator*^a

Strain	Carbon source ^b	DCW ^c [g/L]	PHA ^d [g/L]	Content ^d [wt%]	Composition ^d [mol%]	
					C4	C6
H16	0.5% Fructose	2.0	1.2	60	100	0
	0.5% Octanoate	4.2	3.7	87	100	0
	0.5% Soybean oil	3.6	3.0	82	100	0
	1.0% Soybean oil	3.7	3.1	84	100	0
PHB 4/pJRDEE32d13	0.5% Fructose	1.9	1.1	61	100	0
	0.5% Octanoate	4.4	3.7	84	87.0	13.0
	0.5% Soybean oil	2.5	1.9	77	97.5	2.5
	1.0% Soybean oil	2.7	2.0	75	97.3	2.7
H16C _{Ac}	0.5% Fructose	2.0	1.2	60	100	0
	0.5% Octanoate	4.5	3.8	86	96.1	3.9
	0.5% Soybean oil	3.7	3.1	85	99.3	0.7
	1.0% Soybean oil	5.2	4.7	89	99.3	0.7
H16ΔC/pJRDEE32d13	0.5% Fructose	1.8	1.0	57	100	0
	0.5% Octanoate	4.1	3.6	87	89.2	10.8
	0.5% Soybean oil	2.6	1.8	72	98.0	2.0
	1.0% Soybean oil	2.4	1.7	73	98.0	2.0

^aCells were cultivated for 72 h at 30°C in an MB medium containing carbon source represented.

^b0.5% (w/v) fructose or 0.5-1.0% (v/v) soybean oil were added at the start of cultivation, or 0.1% (w/v) sodium octanoate was added at 12 h intervals from 0 to 48 h.

^cDry cell weight.

^dDetermined by methanolysis/GC analysis of the dried cells or ¹H-NMR analysis of the extracted polymers.

れなかったことから, *phaC_{cn}* のナンセンス変異による極性効果と考えられた。

次に, 染色体上の *phaC_{cn}* を相同性組換えの手法によって, 基質特異性の広い *A. caviae* 由来 PHA シンターゼ遺伝子 *phaC_{Ac}* で特異的に置換した H16C_{Ac} 株を作製した (Fig. 3A). 同様に *phaC_{cn}* を特異的に欠失させ, 高宿主域プラスミドでマルチコピーの *phaC_{Ac}* を導入した H16ΔC/pJRDEE32d13 株を作製した. 得られた組換え株について, Fig. 3B に示すように PCR 解析により目的の相同性組換えが起こっていることを確認した. これらの株について 0.5% フルクトース, 0.5% (0.1% x5) オクタン酸, 0.5% および 1% 大豆油を炭素源とした際の PHA 合成能について検討した. Table 2 に示すように, 従来の組換え株である PHB-4/pJRDEE32d13 株は大豆油を炭素源とすると P(3HB-co-3HHx) を蓄積するが, 野生株 H16 株による P(3HB) 生合成と比較すると培養後の菌体収量や菌体内 PHA 蓄積率が低いことが確認された (Fukui & Doi, 1998). 相同性組換えにより作製した H16C_{Ac} 株は 1% 大豆油で高い菌体収量 (5.2 g/l) と高い PHA 蓄積率 (89 wt%) を示し, 結果的に高い PHA 生産性 (4.7 g PHA/l) で P(3HB-co-3HHx) を生合成した. PHB-4/pJRDEE32d13 株と比較すると生産性は 2.3 倍に達した. この理由の一つとして, H16C_{Ac} 株では変異源処理による不特定遺伝子への変異の影響が存在しないことが考えられた. 一方で, H16C_{Ac} 株により生合成された共重合体中の 3HHx ユニットの分率が 0.7 mol% に低下する現象が見

られた. 酵素活性測定では H16C_{Ac} 株は H16 株と同程度の高い β -ケトチオラーゼ活性および NADPH-アセトアセチル-CoA レダクターゼ活性を示したが, PHA シンターゼ活性は H16 株や PHB-4/pJRDEE32d13 株より低い値であった (Table 1). これまでの研究から PHA シンターゼ活性と PHA 蓄積率には特に相関は見られないこと (Fukui & Doi, 1997) から, PHB-4/pJRDEE32d13 株と比較した際の H16C_{Ac} 株の高い PHA 蓄積率と 3HHx 分率の減少は 3HB-CoA モノマーの効率的な供給と, それによる 3HHx-CoA モノマー供給の相対的な減少の結果であることが推測された. 共重合組成はポリマー物性に大きな影響を与え, 適度な柔軟性の発現のためには 3HHx 分率 10 mol% 程度が望ましいことから, 今後はこの高い増殖能・PHA 蓄積能を維持しつつ 3HHx 分率を向上させる代謝改変が必要である. *C. necator* の PHA シンターゼ遺伝子を欠失させ, *phaC_{Ac}* をプラスミドで導入した H16ΔC/pJRDEE32d13 では, 意外なことに従来の PHB-4/pJRDEE32d13 とほぼ同等 P(3HB-co-3HHx) 生産能を示した. 詳細な理由については現在検討中であるが, H16ΔC 株では染色体上の PHA シンターゼ遺伝子进行操作した影響として β -ケトチオラーゼ活性が低下していた. β -ケトチオラーゼは PHA 生合成系酵素であるとともに脂肪酸 β -酸化系酵素でもあることから, β -ケトチオラーゼの活性が大豆油での菌体増殖や 3HHx-CoA モノマーの供給に関係していることを推測している.

糖質を原料としたポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸) 共重合体 [P(3HB-co-3HP)] の微生物合成

第二モノマーユニットとして側鎖のない3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) を含む P(3HB-co-3HP) も、3HP ユニット分率の増加に伴って融点や結晶化度が低下することが示されている。しかしこれまで、この共重合体を微生物合成するためには *C. necator* や *Alcaligenes latus* といった P(3HB) 生産菌に 3HP などの前駆体を含む混合炭素源を与える必要があった (Hiramitsu & Doi, 1993; Shimamura *et al.*, 1994; Valentin *et al.*, 2000; Wang & Inoue, 2001)。しかし、このような前駆体の添加はコスト上昇などにつながることから、バイオマスのみを原料として生産できることが望ましい。3HP の添加による P(3HB-co-3HP) の生合成が可能な *C. necator* などでは、その PHA シンターゼは 3HP-CoA を基質とすることができると言える。そこで、細胞内で 3HP-CoA を生成させることで単一炭素源から P(3HB-co-3HP) 共重合体を生合成することを試みた。

3HP-CoA は通常の微生物における代謝には存在しない中間体であるが、筆者らは緑色非硫黄細菌 *Chloroflexus aurantiacus* が有する代謝経路に着目した。

Ch. aurantiacus は光エネルギーと二酸化炭素で生育可能な光合成独立栄養微生物であるが、その炭酸固定経路は植物・藻類・ラン藻や多くの光合成細菌が有するカルビン・ベンソンサイクルとは全く異なる、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル (3HP サイクル) と命名された経路であることが見出されている (Herter *et al.*, 2001)。この炭酸固定経路ではアセチル-CoA を出発物質とし、2 分子の二酸化炭素を固定してグリオキシル酸を生成しつつアセチル-CoA を再生するが、その名称にあるように 3HP が重要な中間体となっている。すなわち、この代謝系の前半ではアセチル-CoA に 1 分子の二酸化炭素が結合したマロニル-CoA が、この経路に特異的な酵素マロニル-CoA レダクターゼにより 3HP に還元される (Hugler *et al.*, 2002)。次いで、やはりこの経路に特異的な多機能酵素プロピオニル-CoA シンターゼにより遊離 CoA-SH との結合・脱水・還元によりプロピオニル-CoA に変換されるが (Alber & Fuchs, 2002)、その過程で 3HP-CoA が中間体として生成する。アセチル-CoA からマロニル-CoA を生成するアセチル-CoA カルボキシラーゼは脂肪酸 *de novo* 合成経路の初発酵素として普遍的に存在する酵素であるから、マロニル-CoA レダクターゼとプロピオニル-CoA シンターゼ中の 3HP-CoA シンターゼドメインを機能させ

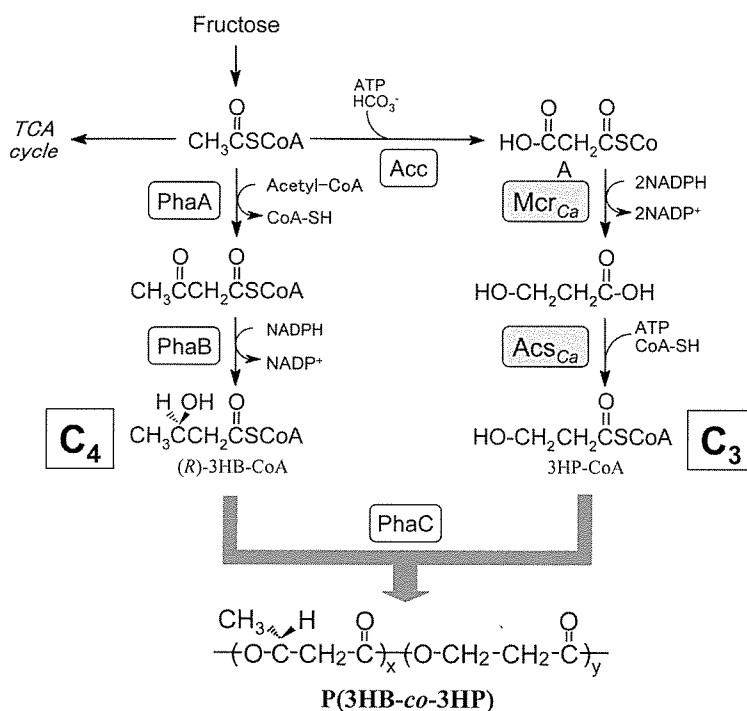


Fig. 4 Artificial pathway for biosynthesis of P(3HB-co-3HP) copolymer from fructose in *C. necator*. PhaA, β -ketothiolase; PhaB, NADPH-acetoacetyl-CoA reductase; PhaC, PHA synthase; Acc, acetyl-CoA carboxylase; Mcr_{Ca}, malonyl-CoA reductase from *Ch. aurantiacus*; Acs_{Ca}, propionyl-CoA synthetase domain in propionyl-CoA synthase from *Ch. aurantiacus*.

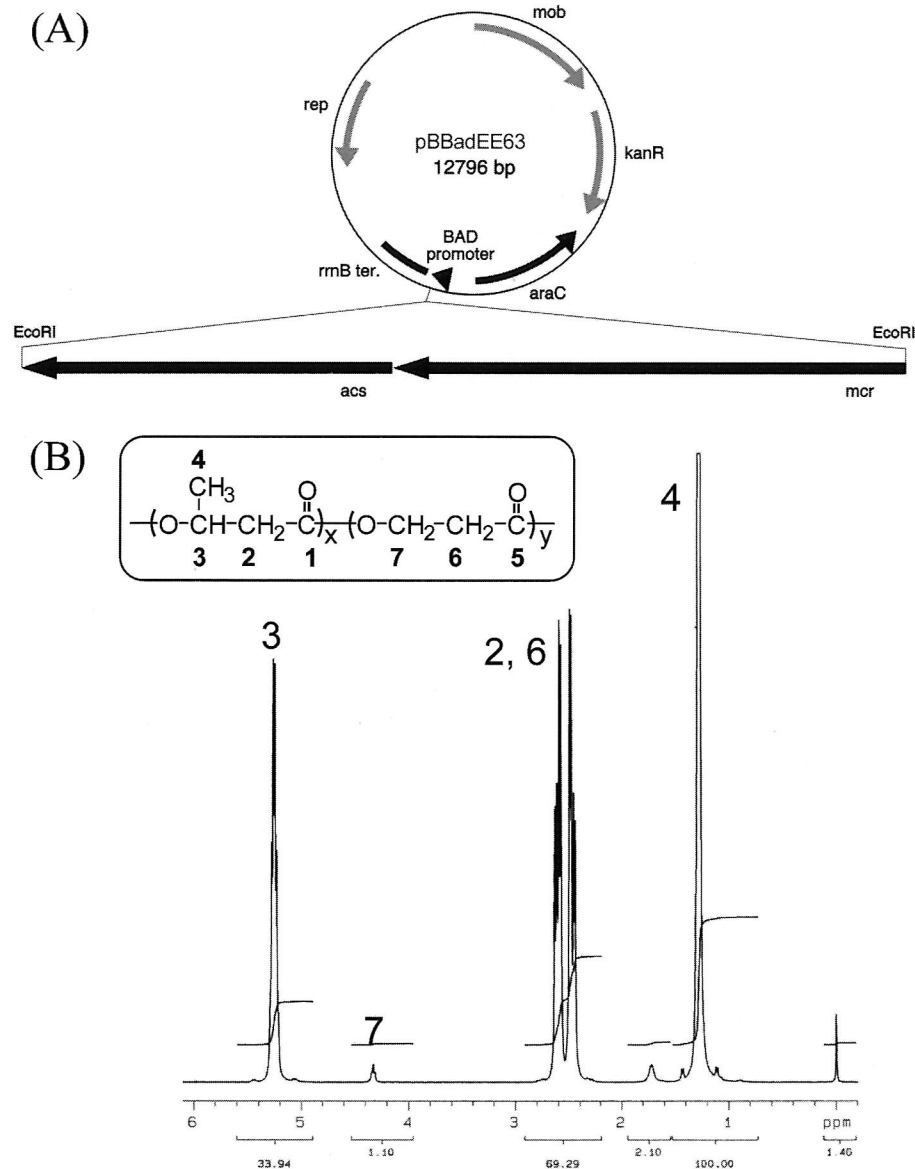


Fig. 5 (A) Schematic drawing of recombinant plasmid pBBadEE63 used for engineering *C. necator*. (B) ^1H -NMR spectrum of P(3HB-co-1.6 mol% 3HP) synthesized by engineered *C. necator* from fructose. The copolyester was isolated from the cells of *C. necator* JMP134/pBBadEE63 grown on 0.5% fructose for 72 h at 30°C with addition of 0.01% L-arabinose at 12 h.

ば細胞内での 3HP-CoA 供給が期待される (Fig. 4). そこで、マロニル-CoA レダクターゼ遺伝子 (mcr_{Ca}) と、プロピオニル-CoA シンターゼ中の 3HP-CoA シンターゼドメインをコードする遺伝子領域 (acs_{Ca}) をクローニングし、アラビノースの添加で誘導可能な BAD プロモーター下流に両遺伝子を配置したベクター、pBBadEE63 (Fig. 5A) を作製し、*C. necator* 野生株である JMP134 株または H16 株に接合伝達により導入した。得られた組換え株をフルクトースを単一炭素源として二段培養を行い、二段目開始時に 0.01% アラビノ

ースを添加して外来遺伝子の発現を誘導したところ、生合成されたポリマーは P(3HB-co-3HP) 共重合体であることをガスクロマトグラフィーおよび ^1H -NMR (Fig. 5B) によって確認した。この際の共重合体中の 3HP 分率は 1.6 mol% であり、PHA 蓄積率は 36.5 wt% であった。宿主 (JMP134 株および H16 株) や培養方法 (一段培養および二段培養)、アラビノース濃度について検討したが、3HP 分率は最大で 2.1 mol% であった (Table 3)。一段培養では、3HP 分率は若干低下する (0.9~1.2 mol%) もの、高い菌体内 PHA 蓄積率

Table 3 P(3HB-*co*-3HP) biosynthesis from fructose by recombinant strains of *C. necator* harboring artificial 3HP-CoA supplying pathway

Strain	Cultivation	Induction ^c	DCW ^d	Content ^e	Composition ^e [mol%]	
		[% arabinose]			C4	C3
JMP134/pBBadEE63	1-step ^a	0	2.1	63	99.6	0.4
		0.01	2.0	62	99.1	0.9
		0.1	1.8	55	98.8	1.2
	2-step ^b	0.01	2.0	37	98.4	1.6
		0.1	2.5	31	97.9	2.1
H16/pBBadEE63	1-step ^a	0.01	1.9	59	99.4	0.6
		0.1	1.8	57	99.0	1.0

^aCells were cultivated for 72 h at 30°C in an MB medium containing 0.5% fructose.

^bCells were first cultivated for 24 h at 30°C in an NR medium, and then transferred into a nitrogen free- MB medium containing 0.5% fructose.

^cL-Arabinose was added into the media at 12 h for 1 step cultivation, or was added into the second media at 0 h for 2-step cultivation with the represented concentration.

^dDry cell weight.

^eDetermined by methanolysis/GC analysis of the dried cells or ¹H-NMR analysis of the extracted polymers.

(55~62 wt%) が得られた。現時点では得られた共重合体中の 3HP 分率は高くなく、改善の必要はあるものの、本成果はバイオマスを単一炭素源として P(3HB-*co*-3HP) 共重合体を生合成した初めての例である。

考 察

上述のように筆者らは染色体上の遺伝子操作や、第二モノマーユニットを供給する人工代謝経路を機能させる遺伝子組換えにより、バイオマスのみを炭素源として共重合ポリエステルを生合成可能な微生物株を作製した。プラスミド導入による遺伝子組換え株を物質生産に利用する際にはプラスミド脱落による形質不安定性がしばしば問題となるが、染色体の操作による組換え株ではそのような問題が起こりえないことから有利である。現時点では、作製した組換え株のポリエステル生産性や、合成された共重合体の組成などにまだまだ改善すべき点が多い。特に組成の問題は重要で、柔軟で使いやすいポリエステルとするには 10 mol% 程度の第二モノマーユニットをポリマー鎖中に導入することが必要である。さらに多様な用途に対応できるプラスチックとするには様々な物性の PHA を作り分けることが望ましく、そのためには組成や分子量の制御法を確立しなければならない。また、昨今のバイオエタノール生産で問題とされているように、原料を食料供給と競合しないものとすることも重要である。

近年の環境意識の高まりとともに、生分解性プラスチックやバイオマスプラスチックへの期待は大きくなってきている。将来的に微生物ポリエステルの生産と利用が産業として発展し、循環型社会への転換に貢献

できることを望みたい。

要 約

微生物によって合成されるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) はバイオマスを原料として生産可能な生分解性プラスチックであることから、環境低負荷型の材料として期待されている。本研究では高物性な共重合バイオポリエステルを効率よく生合成する微生物株の作製を目的とした。ポリ ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) 生産菌である水素細菌 *Cupriavidus necator* について、相同性組換えにより本来の PHA シンターゼ遺伝子を基質特異性の広い *Aeromonas caviae* 由来遺伝子 *phaC_{Ac}* に置換した H16C_{Ac} 株を作製した。得られた H16C_{Ac} 株は植物油を炭素源として良好に増殖し、ポリ ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-*co*-3HHx)] 共重合体を蓄積した。本株は従来の組換え株と比較して 2.3 倍の共重合ポリエステル生産性を示しものの、物性向上に重要な 3HHx の分率低下が見られた。一方、ポリ ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシプロピオン酸) [P(3HB-*co*-3HP)] の微生物合成には、3-ヒドロキシプロピオン酸などの化合物を前駆体として培地に添加しなければならなかった。そこで緑色非硫黄細菌 *Chloroflexus aurantiacus* の炭酸固定経路である 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルにおいてアセチル-CoA から 3HP-CoA に至る経路に着目した。この経路に特異的な 2 つの酵素遺伝子を *C. necator* 野生株に導入することで、フルクトースを単一炭素源として P(3HB-*co*-1.6 mol% 3HP) を生合成させることに成功した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 御船 淳, 福居 俊昭 (2007) 組換え微生物によるポリ (3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサ酸) 共重合ポリエステルの生合成, 日本農芸化学会2007年度大会 (東京).
- 2) 福居俊昭 (2007) バイオマスを単一原料とする共重合ポリエステルの微生物合成, 日本化学会第87春期年会 (大阪).
- 3) Fukui, T. (2007). Production of biodegradable copolyesters by recombinant bacteria from biomass, International Conference on Bio-based Polymeric Materials 2007, Yokohama, Japan.
- 4) 福居俊昭, 鈴木麻美絵, 中村 聡 (2007) バイオマスを単一炭素源とした共重合ポリエステルの微生物合成, 第10回日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム (東京).
- 5) Fukui, T. (2007). Production of biodegradable copolyesters by recombinant bacteria from biomass, Workshop on Bio-based Polymeric Materials 2007, Taipei, Taiwan.
- 6) Fukui, T. (2008). Production of biodegradable copolyesters by recombinant bacteria from biomass, International Conference on Bio-based Polymeric Materials 2008, Yokohama, Japan.
- 7) 折田和泉, 西川浩太, 中村 聡, 福居俊昭 (2008) メタノールを単一炭素源とした共重合ポリヒドロキシアルカン酸の生合成, 日本農芸化学会2008年度大会 (名古屋).
- 8) 岩澤玲子, 折田和泉, 中村 聡, 福居俊昭 (2008) グルコーストランスポーター遺伝子の導入によるグルコース資化性 *Ralstonia eutropha* の構築, 日本農芸化学会2008年度大会 (名古屋).
- 9) 長 健太, 原田和生, 福崎英一郎, 中村 聡, 福居俊昭 (2008) バイオポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* のメタボローム解析, 日本農芸化学会2008年度大会 (名古屋).
- 10) 鈴木麻美絵, 中村 聡, 福居俊昭 (2008) 糖質を単一炭素源としたポリ (3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸) の微生物合成, 日本農芸化学会2008年度大会 (名古屋).

原著論文

- 1) Mifune, J., Nakamura, S. & Fukui, T. (2008). Targeted engineering of *Cupriavidus necator* chromosome for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Can. J. Chem.* **86**: 621-627.

新聞・雑誌発表

- 1) 福居俊昭 (2008) “柔軟性高い生分解性プラスチック, 微生物のみから作製”, 日経産業新聞2008年1月9日.
- 2) 福居俊昭 (2008) “画期的なバイオマス生分解性プラスチック”, M&E 第35巻 3号 pp.18-19.

特許

- 1) 福居俊昭, 鈴木麻美絵 (2007) 共重合ポリエステルの製造法, 特願2007-057269.
- 2) 岩澤玲子, 折田和泉, 福居俊昭 (2008) *C. necator* にグルコース資化性を付与する方法, およびその形質転換体を用いた PHA の製造方法, 特願2008-050655.

謝 辞

本研究の遂行にあたり, 多大なる助成を賜りました財団法人発酵研究所に厚く御礼申しあげます. また共同研究者である鈴木麻美絵 技術職員, 折田和泉 博士研究員 (東京工業大学) および研究室の学生諸氏に深謝いたします.

文 献

- Alber, B.E. & Fuchs, G. (2002). Propionyl-coenzyme A synthase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation. *J. Biol. Chem.* **277**: 12137-12143.
- Doi, Y., Kitamura, S. & Abe, H. (1995). Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* **28**: 4822-4828.
- 福居俊昭 (2002). 生分解性プラスチックとしての微生物ポリエステル, 今中忠行編「微生物利用の大展開」, エヌ・ティー・エス, pp. 1003-1011.
- Fukui, T. & Doi, Y. (1997). Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4821-4830.
- Fukui, T. & Doi, Y. (1998). Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 333-336.
- Fukui, T., Kichise, T., Iwata, T. & Doi, Y. (2001). Characterization of 13kDa granule-associated protein in *Aeromonas caviae* and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. *Biomacromolecules* **2**: 148-153.
- Fukui, T., Shiomi, N. & Doi, Y. (1998). Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* **180**: 667-673.
- Haywood, G.W., Anderson, A. J., Chu, L. & Dawes, E. A. (1988). The Role of NADH-linked and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 259-264.
- Herter, S., Farfing, J., Gad'on, N., Rieder, C., Eisenreich, W., Bacher, A. & Fuchs, G. (2001). Autotrophic CO₂ fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: Study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle. *J. Bacteriol.* **183**: 4305-4316.
- Hiramitsu, M. & Doi, Y. (1993). Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

- hydroxypropionate). *Polymer* **34**: 4782-4786.
- Hugler, M., Menendez, C., Schagger, H. & Fuchs, G. (2002). Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation. *J. Bacteriol.* **184**: 2404-2410.
- Kato, M., Bao, H. J., Kang, C. K., Fukui, T. & Doi, Y. (1996). Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 363-370.
- 木村良晴, 小原仁美 (2007). バイオベースマテリアルの新展開, シーエムシー出版 生分解性プラスチック研究会 (2006). 入門生分解性プラスチック技術, オーム社
- Madison, L.L. and Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 21-53.
- Philip, S., Keshavarz, T. & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**: 233-247.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shimamura, E., Scandola, M. & Doi, Y. (1994). Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromolecules* **27**: 4429-4435.
- Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering - transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technology* **1**: 784-791.
- Slater, S., Houmiel, K. L., Tran, M., Mitsky, T. A., Taylor, N. B., Padgett, S. R. & Gruys, K. J. (1998). Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **180**: 1979-1987.
- Valentin, H.E., T.A. Mitsky, D.A. Mahadeo, M. Tran, and K.J. Gruys. (2000). Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5253-5258.
- Valentin, H.E. and Steinbuchel, A. (1994). Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty-acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 699-709.
- Wang, Y. and Inoue, Y. (2001). Effect of dissolved oxygen concentration in the fermentation medium on transformation of the carbon sources during the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) by *Alcaligenes latus*. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**: 235-243.

発酵研究所研究報告 第22号【非売品】

平成20年12月10日 印刷

平成20年12月25日 発行

編集責任者 駒形和男

編集委員 杉山純多，豊島久真男

中瀬 崇，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