HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	菌株保存と分類の話題
Author(s)	阿部, 歩
Description	研究・技術発表（ポスターセッション）
Citation	北海道大学大学院農学研究科技術部研究・技術報告, 12, 11-15
Issue Date	2005-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35477
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p11-15.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

菌株保存と分類の話題

応用生命科学専攻　分子生命科学講座　阿部　歩

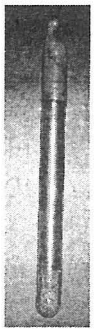
【目的】　北海道大学大学院農学研究科応用菌学分野は，微生物に関する研究を行っているが，同時に菌株保存機関(AHU)としての役割も果たしている．現在，1000 株以上の菌株を保有しているが，植継ぎによる保存を繰り返すことにより，コンタミネーションや死滅，変異などが起こることが大きな問題となっている．微生物には多くの種類があり，それぞれについての特徴を全て理解する事は不可能である．そのため，保存期間を長くして植継ぎを少なくすることは大変重要である．当機関では，スラント（斜面培養），グリセロールによる凍結保存（-80℃），L-dry（減圧乾燥したアンプルによる保存，4℃）の３種類で保存している．

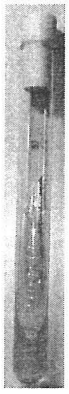
昔は同じ種とされていたものが分けられたり，逆に統合されるなど，微生物の種は次々と変化している．特に，近年の分子生物学的手法による分類法の発展はめざましく，細菌学の世界では rRNA の配列が分類を行うにあたって必須の情報でもある．しかしながら，カビや酵母，きのこのいわゆる真菌類の世界ではまだまだ形態学的な情報や生理学的な情報での分類が主であり，分子生物学的手法との整合性を図ることが今後の課題となっている．

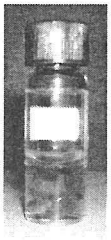
我々は乳酸生成をする糸状菌を探索するプロジェクトで研究を行っているうちに，発酵パターンや DNA レベルでの情報から今まで１種とされていた菌が，２種に分けた方が良いのではないか，また一方で他の属とされていた菌ではあるが大変よく似た菌であるので分けるのはどうかという結論に至った．しかしながら，上記のような理由から真菌類において，分子生物学的手法のみから分類を再考するには難しく，現在も様々な情報を集めているところである．

【微生物の保存】　微生物を保存するには様々な方法があるが，出来れば長期間保存することが望ましい．微生物は栄養源を含んだ寒天培地で増殖を行うが，当然の事ながら栄養源が枯渇してしまえば死滅してしまう．また，時には代謝物によりその生育が抑えられてしまったりもする．そのため，新鮮な培地に移しかえる必要がある．しかし，この作業は外界との接触を必要とする．清浄な環境下で行っているがその危険性を０にはなかなか出来ない．そのため，この作業中に外界からの他の微生物の混入（コンタミネーション）を起こすことがまれにある．また，この作業は微生物にとってストレスとなるため，変異を起こしやすくなり，初期に保存された状態と違ってきてしまうという問題もある．一般的に用いられている方法はスラントと呼ばれる微生物の生育に必要な栄養分を寒天で固めた斜面培地に生育させ，その後低温（4℃）で保存する方法，また，Glycerol の水溶液に液体培地で生育させた微生物を懸濁したり，寒天培地に生育した菌を寒天ごと小片に分けて Glycerol 水溶液中で超低温　(-80℃) 保存する方法，保護剤に微生物を懸濁して真空乾燥して低温保存（4℃）する方法がある．微生物には，大腸菌に代表されるような原核生物から，酵母，カビ（糸状菌）な

ど様々な種類があるが，微生物ごとに最も良い方法が異なっている．そのため，当機関では多少煩雑ではあるが，それぞれの方法で保存を行っている．


L-dry アンプル

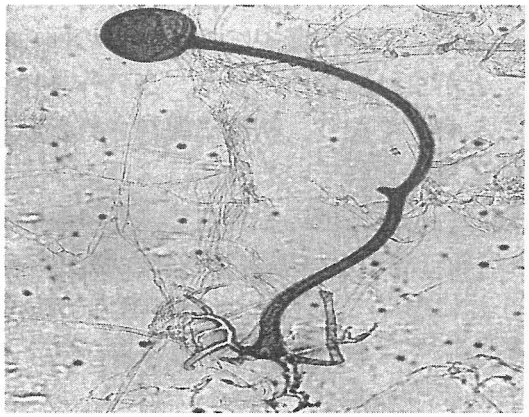

スラント


Glycerol 保存

【微生物の分類に関する研究】

微生物において，近年新たな種の発見や解析方法の発展により，今までの分類がさらに分けられたり統合されたりと変化している．そのため保存菌株でも保存を始めた当時と名称が変わっていることも多々ある．特に近年の分子生物学的手法による分類法の発展はめざましく，細菌学の世界ではrRNAの配列が分類を行うにあたって必須の情報でもある．一方で，カビや酵母，きのこのいわゆる真菌類の世界ではまだまだ形態学的な情報や生理学的な情報での分類が主であり，分子生物学的手法との整合性を図ることが今後の課題となっている．

現在，農産加工副産物（特にポテトパルプ）を発酵させるスターターとしての微生物を探索するプロジェクトに関わっている．ポテトパルプは馬鈴薯でんぷん製造を行う際の副産物であり，年間10万トンもの量が発生している．ポテトパルプ中にはでんぷんが多く残存しており，栄養価値が高く，飼料としての活用が期待できるが，そのままでは腐りやすく，家畜の嗜好性も低いので十分な活用が計られていなかった．そこで，生でんぷん発酵性のある *Rhizopus oryzae* を用いてでんぷんから乳酸を生成させ，pHを下げて保存性を良くすると共に家畜の嗜好性も高めようとする研究が行われた．



*Rhizopus*属は真菌類の１種であり，俗称は”くものすカビ”と言われている．写真のように顕微鏡下で観察すると根の様なものが見られる．この根”rhizoid”があることが，この属の特徴である．現在の*Rhizopus*属分類体系は1970年にSchipperとStalperによって行われたもので，そこではそれまで数多くの種が報告されていたものを，主に形態から再分類し，*stolonifer*-groupと*microsporus*-goup，*oryzae*の大きく３つにグループ分けされている．*oryzae*だけはグループでなく，１種であることに注目して頂きたい．これは他の２グループに入りきらなかった中間型のものが全てひとまとめにされてしまっていることを意味する．しかし，よく見ていくと*R. oryzae*には乳酸を生成する菌と全然生成しない菌がいることがわかってきた．

まず最初に，乳酸生成能について，保存されている*R. oryzae*菌株を用いて調べたところ，乳酸生成を行う菌と，乳酸を生成せず主としてフマル酸を生成する菌に分けられた．これらの乳酸生成菌と乳酸非生成菌の間に遺伝的な差異があるかどうかを調べるために，rDNA-ITSの塩基配列を決定し，比較を行った．細菌学の分類ではrDNAがよく使われる．rDNAは28S，18S及びその間であるITS（internal transcribed spacer）があるが，種の分類に用いられているのはITSである．

```
                41                  411                 511                 556
NBRC4732(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC4726(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC4747(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC4749(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC4754(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC5441(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC5442(B)     AAGCGCCTTACCTCTTA.....GTGGTAATGGGTCGC.....ATCTTTTTCTTTGGTT.....TCCAGCAACTTT.....
NBRC5739(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC5384(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC4766(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC9364(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC4706(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC4707(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
NBRC4716(A)     AAGCGCCTTA-C-CTTA.....GTGGTGATGGGTCGC.....ATCTTTTTTTTTGGTT.....TCCAGTAACTTT.....
                      * *                 *                   *                   *
```

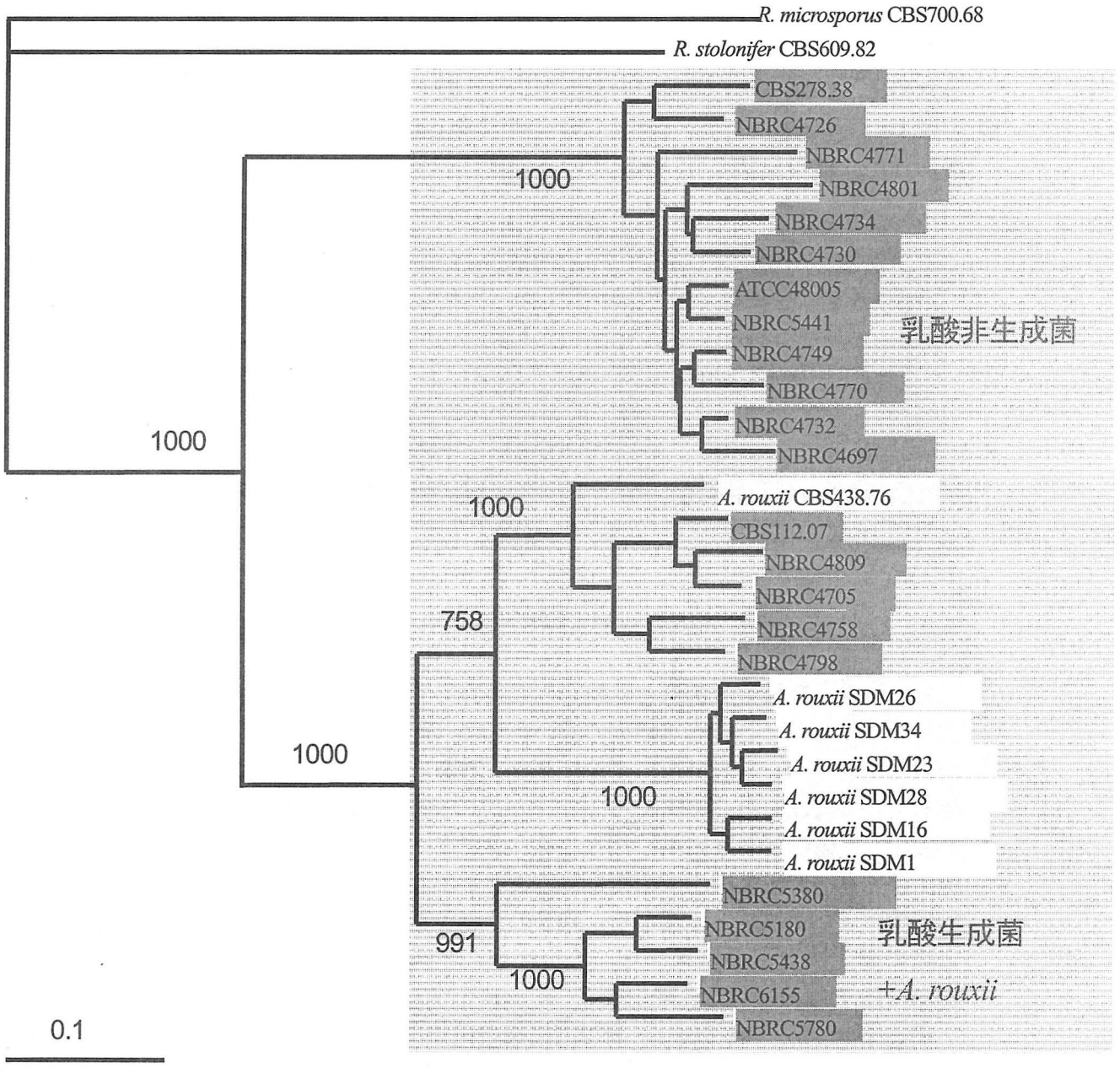
乳酸生成(A)*R.oryzae* と乳酸非生成(B)*R. oryzae* の ITS 配列の違い

その結果，乳酸生成菌群と乳酸非生成菌群の間に５塩基の明確な差異があることが明らかになった．この塩基配列の違いを元に，乳酸生成菌からのみ増幅が起こるようなPCRプライマーを設計し，タッチダウンPCRを行うことで，選択的PCRの反応系を作ることに成功した．実際に，インドネシアの発酵食品とそのスターターから直接DNAを抽出し，選択的PCRに供したところ，ラギタペとタペケタンから増幅が見られ，実際にラギタペから乳酸生成菌株を得ることができた．しかし，これらの菌株の形態学的特徴は*R. oryzae*とは異なり，胞子のう胞子をほとんど形成しなかった．この特徴と糖の資化性などの結果から，*A. rouxii* と同定された．得られた *A. rouxii* のrDNA-ITSの塩基配列は乳酸生成 *R. oryzae* と全く相同であった．

Rhizopus 属と *Amylomyces* 属は共に接合菌類に属する．これらの属は感染性を持つ菌も含むが，むしろ食品産業に用いられる重要な菌として知られている．例えば *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* はテンペ製造に用いられる菌として有名で

ある．*Rhizpus oryzae* と *Amylomyces rouxii* はアルコール製造における糖化に用いるアミロ菌として知られている．

rDNA-ITS 配列は分類によく用いられるものではあるが，これは遺伝子情報の一部に過ぎない．そのため，遺伝子全体ではどの程度違っているのか，種を分けるほどの違いがあるのかを調べるために，AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法を用いてゲノム全体でどの程度異なっているのか調べた．その結果，*R. oryzae* においてはやはり２つのクラスターに分けられ，また *A. rouxii* もそのクラスター内部に含まれるという結果となった．現在，*Rhizopus* と *Amylomyces* は異なる属として分類されているが，今回の結果は現行の分類に疑問を投げかける良い材料になったと思われた．



AFLP による解析

【まとめ】菌株保存機関として，微生物を死滅させることなく，さらに同じ状態を保たせるように保存するために，いくつかの保存方法を組み合わせている．これは，微生物によって最も良い保存方法が異なるためである．

現在の*Rhizopus*属の分類は1970年にSchipperとStalperによって再分類されたもので，それまで多くの種が存在したが，１０種とコンパクトになった．その中で*R. oryzae*は多くの種が１種に統合された．その*R. oryzae*のDNA情報を解析した結果，ITSでは４カ所５塩基の違いにより，２種類に分類できた．AFLP解析からもこのITSの違いと同様に２種類に分けられた結果を得た．これまでにわかっている生理学的情報（有機酸生産能力の違い）からも，２種に分けるのが妥当であると思われた．以上のことから，*R. oryzae*の分類にITS領域の塩基配列解析が有効であり，その結果，同定の迅速化を図ることができると思われた．また，*Amylomyces rouxii*という別の属に分類されている菌についても，今後さらなる検討が必要と思われる証拠を得ることが出来た．

このように，大学における保存機関として単に菌株の分譲を行うだけでなく，現行の分類の確認や新たな分類方法の確立，検証を行っていくことは，大変重要であると思われる．