



ニュースレター

No. 14

JCM の 30 年と理研ライフサイエンス

理研社会知創成事業
本部長 土肥 義治



JCM ニュースレター

(2011年)

No. 14 目次

JCM の 30 年と理研ライフサイエンス (土肥義治)	1
微生物系統保存施設設立のころ (駒形和男)	2
JCM30 年間の歩み	4
昨年および今年度の事業から	5
JCM 株を使った研究	
<i>rpoB'</i> 遺伝子による好塩性古細菌 <i>Halobacteriaceae</i> 科の系統分類 (峯岸宏明)	7
ダイオキシン分解プラスミド pCAR1 の宿主域の解析 (新谷政己)	8
JCM のリソース事業紹介 (第3回 微生物株の品質検査)	9
コラム	11
編集後記	11

理化学研究所微生物系統保存事業 (Japan Collection of Microorganisms: JCM) は、1981年に事業を開始して以来、本年度で30年目を迎えます。まずは、国内的にも国際的にも高い評価と信頼を得ている JCM を育て築いてこられた歴代の事業責任者の先生方と、技術開発と基盤研究を組織的に着実に進めてこられた研究者、技術者の方々に心からお祝いを申し上げます。



この30年間で、JCM が微生物の関連学会で大きな信頼を勝って、世界中の中核的な微生物保存機関として、微生物の収集、同定、保存、提供のバイオリソース事業を推進されていることを、理研所員の一人として誠に誇らしく思います。30年を振り返りますと、JCM は理研のライフサイエンスの発展を先導する歩みであったと思います。1981年当時の理研の年間予算は100億円程度であり、職員数は600人余りでした。2010年現在の年間予算は1,000億円、そして職員数は3,200人です。

ここで、JCM 事業を始めた1981年前後の理研の状況を振り返ってみたい。1971年に政府は、科学技術会議の答申を受けて、「ライフサイエンス研究推進センター」の構想を抱く。その後、センター構想の中核機関として理研が機能することを期待され、1974年に理研にライフサイエンス推進部が設置された。推進部の開設にあたり、ライフサイエンス担当の森脇大五郎理事は、報告書の冒頭でライフサイエンス研究推進のあり方について以下のように記述している。

「ライフサイエンスは生物科学を中核として、自然科学全般、さらには人文科学、社会科学を含め、もっとも総合的な立場で生命そのものや、自然の中での人間の問題を理解し解決しようとするもので、人類が世代を超えて生き続けるための重要な指針ともなり得る科学および技術である。ライフサイエンスの研究では、生命の本質と生物の諸機能を解明する基礎的研究とともに、健康、環境、人口、食糧、エネルギー等人類が直面する諸問題の解決を自然との調和の中で図る目的志向的研究の基礎から応用までを総合的に遂行すべきものとする」と考える」



このような科学的展望のもとで、理研で最初に具体的プロジェクトとして開始された事業が、「微生物系統保存事業」と「新微生物利用技術の開発事業」であった。1981年に、「ライフサイエンス培養生物部（JCM）」と「筑波建設業務部」が設置された。同時に、筑波進出の準備組織として筑波遺伝子工学研究室（安藤忠彦主任研究員）を和光に設置した。1984年に研究施設と研究棟が完成して、ライフサイエンス筑波研究センターを開設した。その後、1986年にフロンティア研究システムが発足し、ライフサイエンス関連の研究プロジェクト（思考機能研究、生体ホメオスタシス研究など）を推進した。JCM事業と筑波研究センターは、主任研究員会議傘下で定年制の研究者を主体に研究開発事業を進めた。一方、フロンティア研究システムでは、任期制の研究者が時限の研究プロジェクトを推進するという新しい仕組みが導入された。

フロンティア研究システムの発展形として、1997年に脳科学総合研究センターがライフサイエンス戦略研究センターとして最初に設置された。1998年にはゲノム科学総合研究センターが設立され、2000年には、発生・再生科学総合研究センター、遺伝子多型研究センター、植物科学研究センターの3センターが開設した。さらに2001年には、免疫・アレルギー科学総合研究センターとバイオリソースセンターが開設され、理研のライフサイエンス研究は著

しく強化された。

ライフサイエンス筑波研究センターの活動は、1997年から発足した各戦略研究センターにその機能が移ったこともあり、2000年12月に役割を終えた。センターの技術開発部門を改組して、実験動物のマウス系統、実験植物の系統、細胞材料、遺伝子材料の収集、保存、提供を行う我が国の中核機関として、バイオリソースセンターが2001年1月に開設した。JCMは理研中央研究所の一部門として活動していたが、2004年7月にバイオリソースセンターの微生物材料開発室の事業として継続することになった。30周年を迎える2011年度に、JCMの活動拠点が和光から筑波に移る予定である。

現在、理研は野依理事長の強い指導理念の下で、社会知創成事業を推進している。本事業は、人類社会が直面している多様な課題の解決を目指して組織横断的研究を進めて新しい科学技術（社会知）を生み出すことを使命に、2010年4月に発足した。創薬・医療技術基盤プログラムとバイオマス工学研究プログラムを立ち上げた。

1976年に森協理事が中心となり提言した「ライフサイエンス研究推進のあり方」が、三十数年を経て理研において研究体制は実現しつつある。これから、理研ライフサイエンスの成熟期であろう。大きな成果を期待したいと思う。

微生物系統保存施設の設定のころ

元・理研 ライフサイエンス培養生物部長 駒形 和男

理化学研究所の微生物系統保存施設が Japan Collection of Microorganisms (JCM) として世界に紹介されたのは1981年7月チェコスロバキア（現在のチェコ共和国）のブルノで開催された第4回世界微生物株保存会議（The Fourth International Conference on Culture Collections, ICC-4）のときである。この発表は、JCMの金内長司博士によってなされ、その表題は Initiation of Japan Collection of Microorganisms であった。そのなかで、日本政府は、1971年将来のライフサイエンス発展のための施策を決定し、その実現の第一歩として、1974年理化学研究所にライフサイエンス推進部をもうけ、1978

年微生物系統保存施設を設立したと述べている。

私は、1981年初代の培養生物部部長を拝命した。就任当時、微生物系統保存施設の英名についていろいろの案があったが、設立の背景から Japan Collection of Microorganisms と決定した。これには、JCMをカルチャーコレクションのセンター・オブ・エクセレンスにしたいという意気込みもあった。そして、JCMの顧問であった長谷川武治先生とご一緒に日本微生物株保存連盟の生みの親である坂口謹一郎先生をお訪ねし、施設の英名を Japan Collection of Microorganisms としましたと申し上げたところ「大きく出たね」といわれたのを今でも覚えている。

その際、1983年発行の菌株カタログの初版を持参したが、掲載菌株数は約600株であった。最近の2万を越える保有菌株数に比べれば雲泥の差である。

その後、微生物系統保存施設は組織の改変にともないバイオリソース・センター微生物材料開発室と改名し、その業務はますます拡大し、国際的なネットワークが構築されている。しかし、コレクションの情報豊富な菌株の収集、確実な菌株の保存、迅速な分譲という基本的業務は変わらない。また、バイオリソース・センターにとってその他の重要な業務もあるので、そのことについて述べたい。

細菌分類学は、国際細菌命名規約に基づき新種の記載には基準株の指定と基準株を2カ国の2カ所以上のカルチャーコレクションに寄託することを義務づけている。そして、そのカルチャーコレクションからの「寄託と公開の証明書」(certificate)がなければ細菌の種は正名(correct name)として認められない。従って、信頼のおけるカルチャーコレクションなしに、細菌分類学はなりたたない。年々多数の新種が記載され、2010年は611種が報告されている。そして、新種の基準株とともに、参考株、その他の菌株が信頼できるカルチャーコレクションに寄託されている。これらの菌株は、研究者に分譲され、正確な分類学的比較が可能となるとともに、さまざまな研究分野で用いられている。この点、JCMは国際的に高く評価され、基準株の寄託数で世界第二の地位を確立していることは関係者の努力によるもので嬉しいことである。

昨今、生物多様性についての関心が高まり、国際会議も開催されている。大型な動・植物の域内保存(in situ)に比べ肉眼で観察できない微生物の保存は動・植物とおのずから異なる途を選ばざるを得ない。世界のカルチャーコレクションは設立以来天文学的な数の微生物株を保存し、微生物の域外保存(ex situ)の役割を担ってきた。これらの菌株が農業、製薬、工業、環境問題の研究・開発に貢献してきたことは言うまでもない。一度失った、生物多様性を復活することは、きわめて困難である。一説によると現在カルチャーコレクションに保存されている菌類の菌株を失った場合、それらを再分離し、同定し、コレクションを復活するためには、140年を要するという。他方、マスコミは、途上国と開発国の資源の分配とそれにより得られる利益の配分に目をうばわれているように見受けられる。微生物資源の保存にかかわるバイオリソース・センターにも目を向け

てほしいものである。

また、新薬の創薬にあたって、企業内カルチャーコレクション(in-house collections)は、保存株の多様性に欠けており、また、長期の時間軸から考えると菌株保存に要する費用と、新規に菌株を分離する費用とがそれほど変わらないという説がある。これは生物資源を利用する立場からの論であって、これを、公開されているコレクション(public culture collections)の内容と混同してはならない。生物の多様性を保全することは一部の産業界のためにあるのではなく、人間を含めた地球上の全生物が互いに関わりあい、調和のとれた生態系を保ち、等しく生存することを目指している。

また、憂えるべきことは、生物多様性の研究に大きな役割を果たす分類学の研究者の減少である。このことは、別途論じられねばならない問題であるが、緊急の解決策として、多くの研究者を擁し、研究資料・資料の豊富なバイオリソース・センターがその任に当たるべきであろう。このことはまた、開発途上国のカルチャーコレクション担当者の教育・訓練にも関わり、コレクション間の交流も深まり、有意義なことである。

カルチャーコレクションは、他のコレクションと菌株の交換をともなって成長してきた。その際、固有の菌株をもたなくてはその対応ができない。そのためにも、コレクションにおける研究を援助・強化することが必須である。カルチャーコレクションは他のコレクションのコピーであってはならない。また、確実な情報のない菌株は保存の意味をなさない。菌株の保存とともに情報活動が重要なことは言うまでもない。

これらのことの遂行には、バイオリソース・センターに関わる関係者の安定した確保と資金の供給である。いずれの国のカルチャーコレクションも資金に悩まされた歴史をもっており、現在も背負っている。しかし、世界の公開されている主要なコレクションは、何らかの公的な資金援助も受けている。微生物株は人類共有の資産であり、文化財である。われわれは、これを健全な状態で次世代に伝える義務と責任がある。バイオリソース・センターの発展のために、将来を見据えた立場から十分な公的資金の投入を切望する。

JCM30 年間のあゆみ

沿 革

- 1980年 理研・和光キャンパスに微生物系統保存棟（2階建て1,500 m²）が完成。
- 1981年 微生物系統保存事業（Japan Collection of Microorganisms, JCM）を開始。駒形和男ライフサイエンス培養生物部長が就任。
- 1984年 提供業務を開始。
- 1989年 中瀬崇ライフサイエンス培養生物部長が就任。
- 1993年 超低温微生物保存棟（300 m²）が完成。
- 1995年 科学技術振興調整費「アジア地域の微生物研究ネットワークに関する研究」に参加（～1999年）。
- 1999年 生物基盤研究部へ組織改編。
- 2000年 長田裕之生物基盤研究部長が就任。
- 2002年 工藤俊章生物基盤研究部長が就任。
- 2004年 理研バイオリソースセンター（森脇和郎センター長・小幡裕一リソース開発基盤部長）へ組織改編。微生物材料開発室（辨野義己室長）となる。
- 2005年 小幡裕一センター長が就任。
- 2007年 第2期ナショナルバイオリソースプロジェクトの中核的拠点機関（一般微生物）となる。
- 2007年 ISO9001の認証を取得。
- 2009年 大熊盛也室長が就任。



（左）1986年春の微生物系統保存棟。左下は旧・ライフサイエンス推進部によって紹介された微生物系統保存施設設立時のパンフレット表紙。この頃は周りに他の建物が無くJCMは”山の上”と呼ばれていた。



（上）菌株の増加によって厚くなっていったカタログ。（右）現在は大熊室長を含めて16名のスタッフ（派遣1名を含む）、パート12名でJCMを運営しています。



昨年および本年度の事業から

JCMはライフサイエンス培養生物部として1981年に事業を開始してから30周年を迎えました。2004年に組織改編によって理研バイオリソースセンター微生物材料開発室(理研BRC-JCM)となつてからは学術・研究上に重要な「健康と環境の研究に有用な微生物」および「微生物の種の基準となる株」を中心に、そのリソースの充実を図るとともに寄託者・利用者への利便性を一層高めるように努めてまいりました。おかげさまで今日では世界有数の微生物リソース機関の一つとして認められています。寄託者・利用者の皆様や事業に関連した先生方には厚く御礼申し上げますとともに引き続きご支援・ご指導賜りますようよろしくお願い致します。

昨年および本年度の事業実績

昨年度は830株、本年度(平成22年12月20日現在、以下同様)は587株を収集登録し、JCM登録株総数20,072株、公開株数12,058株となりました(図1)。またゲノムDNAリソースも2007年にその提供事業を開始して以来、既に146株の微生物株のDNAリソースを公開しています(遺伝子材料開発室との共同開発)。微生物株収集では細菌・アーキアの新種発表のための寄託も多く、*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM)に提出する「寄託と公開の証明書」の発行数は昨年度が276件、本年度も176件あり、1年間に発表される新種・新亜種の約1/4の基準株がJCMに寄託されていることとなります。一方、ユーザーへの提供数は昨年度が3,762株、本年度が1,920株です。本年度の提供数は昨年度の同時期より若干減少していますが、これは提供手数料の改定、また昨今の経済状況等が影響しているものと考えられます。微生物ゲノムDNAリソースの提供は昨年度が69件、本年度は41件です。

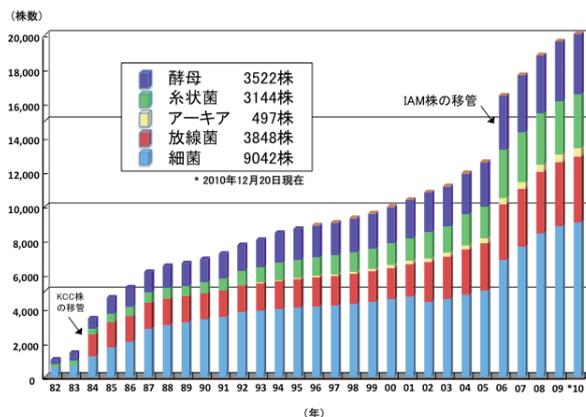


図1. 菌株保有数の推移。

品質管理

JCMでは新規受入株、あるいは登録・保存した菌株も必要に応じて品質を検査しています(詳しくは後述の「JCMのリソース事業紹介」をご覧ください)。2009年度の受入検査では701株中26株(3.7%)、2010年では652株中16株(2.4%)に問題が判明しました。このような場合は寄託者の方に正しい菌株の再寄託を依頼するなど、信頼性のあるリソース確保に努めています。

提供手数料の改定を実施

理研BRCではリソースの収集・保存・品質管理などに関わる経費は運営費交付金を、リソース提供に関わる経費は提供手数料として利用者の方にご負担いただいております。この度、受益者負担の徹底を図るため平成22年3月に提供手数料の改定を行いました。詳しくは下記ホームページ(HP)をご覧ください。

<http://www.brc.riken.jp/inf/distribute/kakaku.shtml>
(理研バイオリソースセンター HP ⇨提供手数料)

JCM株を利用した論文・特許

JCMでは研究コミュニティへの貢献度をはかるためにJCM株を用いた論文や特許事例の調査を行っています。論文では、(A)寄託者がJCMへ寄託した後にJCM番号を記載して発表した論文、(B)JCMから提供を受けた利用者(共同研究を含む)がその菌株を用いて発表した論文、(C)(A)、(B)両方を含む論文に分けることができますが、本調査によって2009年には197報(A, 68報; B, 111報; C, 18報)、2010年には253報(A, 100報; B, 121報; C, 32報)の「JCM株を利用した論文」を把握することができました。一方、JCM株を利用した特許化事例は2009年が14件、2010年が8件です。こうした論文・特許情報は、単に菌株情報の充実だけでなくJCMの事業の方向性を検討する上でも重要な資料となります。JCM株を用いた論文・特許を発表・公開しましたら、どうかご一報いただきますようお願い致します。

技術研修事業

2009年度および2010年度の技術研修を以下のテーマで募集したところ、定員を上回る申し込みがありましたので、それぞれ2回ずつ研修を実施しました。微生物リソースをより効果的にご利用いただくために今後も研修事業を継続する予定です。ご希望の研修テーマがありましたらお知らせ下さい。

2009 年度：DNA-DNA ハイブリダイゼーションに関する技術研修
 2010 年度：糸状菌類の遺伝子解析法と顕微鏡観察・分離法に関する技術研修

広報・宣伝活動

JCM では研究者・技術者の皆様とコミュニケーションを取るべく関連学会等でのブース展示を行っています。また、リソースに関する情報をタイムリーに提供するようにメールニュース(月1回)を発行しています。ブース展示の情報はホームページ・メールニュースでお知らせ致しますので学会に参加される方はどうぞブースまでお立ち寄りください。また、メールニュース受信の申し込みは JCM のホームページより承ります。さらに、一般の方にも微生物やリソース事業の必要性を知っていただくために毎年の理化学研究所一般公開での展示や小冊子(ハロー Microbes: 図2)の配布も行っています。

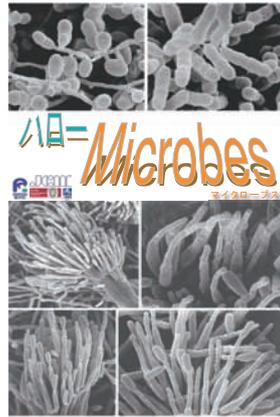


図2. 小冊子(ハロー Microbes)の表紙。

ホームページでは新たに「JCM より入手可能なゲノム配列決定株」や「利用者による研究成果」の情報も公開致しましたのでどうぞご利用下さい(図3)。

また、下記の JCM の紹介記事もどうぞご覧下さい。
 大熊盛也, 伊藤 隆 2010. 微生物研究を支える理研 JCM の役割. 生物と化学 48: 215-218.

健康と環境の研究に関連する JCM 株提供支援

健康と環境の研究に役立つ JCM 株をそれぞれのトピックごとにまとめたチラシを作成し、学会等の展示で配布致しました(図4)。



図4. 提供チラシの一例。

RIKEN BIORESOURCE CENTER
JAPAN COLLECTION OF MICROORGANISMS

JCM
 ON-LINE CATALOGUE OF STRAINS

JCM Top | BRCC Top

Japanese

About JCM

JCM On-line Catalogue

New JCM Strains

Order for Cultures

Deposit of Strains

Genomic DNA

JCM Staff

Publications by JCM Members

JCM Strains in Publications

Links

NBRP

Microbial Genome Sequences and the Corresponding JCM Strains. Last update: Jan. 26, 2011

The number of publication of microbial genome sequences is rapidly increasing. The strains corresponding to those whose genome sequences appear in the databases are available from JCM upon request as listed below (see http://www.jcm.riken.jp/JCM/Ordering_E.shtml). The organisms in the lists are alphabetically arranged by phylum, genus and species names, in this order.

Archaea | Bacteria | Eukaryota

Archaea

Organism	Sequenced strain	JCM accession no.	Database accession no.
Phylum Crenarchaeota			
<i>Aeropyrum pernix</i>	K1	JCM 9820 ^T	BA000002
<i>Desulfurococcus karmchatkensis</i>	1221n	JCM 16383 ^T	CP001140
<i>Hyperthermus butylicus</i>	DSM 5456	JCM 9403 ^T	CP000493
<i>Ignisphaera aggregans</i>	DSM 17230	JCM 13409 ^T	CP002098
<i>Metallophaera sedula</i>	DSM 5348	JCM 9185 ^T	CP000682
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> str. IM2	JCM 9630	JCM 9630 ^T	AE009441
<i>Staphylothermus hellenicus</i>	DSM 12710	JCM 10830 ^T	CP002051
<i>Staphylothermus marinus</i>	F1	JCM 9404 ^T	CP000575

Ref. No.	JCM strain No.	Title	Author	Journal	Vol.	Pages	Year	PubMed ID
A10001	JCM 11346, JCM 12085	Epidemiologic Study of Malassezia Yeasts in Seborrheic Dermatitis Patients by the Analysis of 26S rDNA PCR-RFLP	Oh BH, Lee YW, Chee YB, Ahn KJ	Ann Dermatol	22	149-155	2010	20489804
C10002	JCM 18970, JCM 18971	Desulfurobacterium subsp. oceanis sp. nov., subsp. nov. and Desulfurobacterium subsp. galathea subsp. nov., novel sulfate-reducing bacteria isolated from the oxygen minimum zone off the coast of Peru	Finstad KW, Kjelhaug KJ	Antonie Van Leeuwenhoek	97	221-229	2010	20012196
C10003	JCM 14892	Candida neutromensis sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the sea surface microlayer in Taiwan	Chang CF, Lee CF, Liu SM	Antonie Van Leeuwenhoek	97	35-40	2010	19429338
A10004	JCM 11363	Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces	Santo CE, Moraes PV, Grass G	Appl Environ Microbiol	76	1341-1348	2010	20048058
A10005	JCM 7384, JCM 7385, JCM 7386	Plasmid pAM12 of Paracoccus aerophilus JCM 7388 carries 14 N-dimethylformamide degradation-related genes whose expression is activated by a LuxR family regulator	Dziwet L, Dmowski M, Bie J, Borkus D	Appl Environ Microbiol	76	1881-1889	2010	20118371
A10006	JCM 3201	New vector system for random, single-step integration of multiple copies of DNA into the Rhodococcus genome	Saitani KI, Tamura N, Imoto N, Tamura T	Appl Environ Microbiol	76	2531-2539	2010	20154109
A10007	JCM 7027	Characterization of the serpin-encoding gene of Bifidobacterium breve 210B	Turroni F, Foroni E, O'Connell Moherway M, Bottone F, Gabellieri V, Zomer A, Ferrarini A, et al.	Appl Environ Microbiol	76	3206-3219	2010	20348296

図3. 「JCM より入手可能なゲノム配列決定株」(上), 「利用者による研究成果」(下)のページ。

JCM 株を使った研究

***rpoB'* 遺伝子による好塩性古細菌 *Halobacteriaceae* 科の系統分類**

峯岸 宏明 東洋大学 バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター

様々な生物群を構成している種の系統学的関係を決定する際にはリボソームの小サブユニットを構成する RNA の塩基配列が広く用いられている。リボソーム RNA の塩基配列は保存性が高く、系統関係が離れた生物種同士でも容易に配列の比較ができる。原核生物では 16S rRNA 遺伝子の相同性が 97% 以下であれば別種であると推定できるなど、近年の微生物系統分類において重要な指標となっている。しかし、多くの生物種において複数の異なるコピーが存在する、形態的特徴を重んじてきた従来の分類体系との相違がある、DNA-DNA 相同性との相関がないなど、多くの問題も指摘されている。近年では 16S rRNA 遺伝子以外の様々な遺伝子についても系統分類学的マーカーとして有用性が検討されており、その中で RNA polymerase のサブユニット遺伝子による系統解析も注目されている (Klenk and Zillig, 1994)。

古細菌最大のグループである好塩性古細菌 (*Halobacteria* 綱 *Halobacteriales* 目 *Halobacteriaceae* 科) は 2010 年 12 月現在、38 属 132 種 (内 32 属 119 種が正式に学名として認められている) が発表されている。1997 年には Oren らによって "Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*" が提案されており、属種の同定においては極性脂質組成、

16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの相同値が特に重要なファクターとなっている。しかし、*Halobacteriaceae* 科では多くの種において複数の 16S rRNA 遺伝子コピーが存在し、その中にはコピー間の相同性が低いものもあり、各々の配列で系統樹のトポロジーが大きく異なることが指摘されている (Wright, 2006)。

このような問題を解決すべく、*Halobacteriaceae* 科も RNA polymerase のサブユニット遺伝子である *rpoB'* 遺伝子に基づく系統解析が行われてきた (Walsh *et al.*, 2004; Enache *et al.*, 2007)。しかしながら、これら報告で用いられている塩基配列はその内部配列 (約 1,200 bp) であり、また各属種において使用するプライマーセットも異なり、増幅も困難であるなどの問題点が指摘されていた。

そこで我々は、完全長 *rpoB'* 遺伝子による *Halobacteriaceae* 科の系統関係を解析した (Minegishi *et al.*, 2010)。解析当時にゲノム塩基配列が公開されていた 5 種を用いて RNA polymerase サブユニット H, B', B', A' の塩基配列から新たに増幅・シーケンス用プライマーを作製し、*Halobacteriaceae* 科 86 種 89 株 (うち 84 株は JCM から提供) の *rpoB'* 遺伝子全長 (約 1,800 bp) の塩基配列を解析した。

その結果、塩基配列 1,827-1,842 塩基、推定アミノ酸

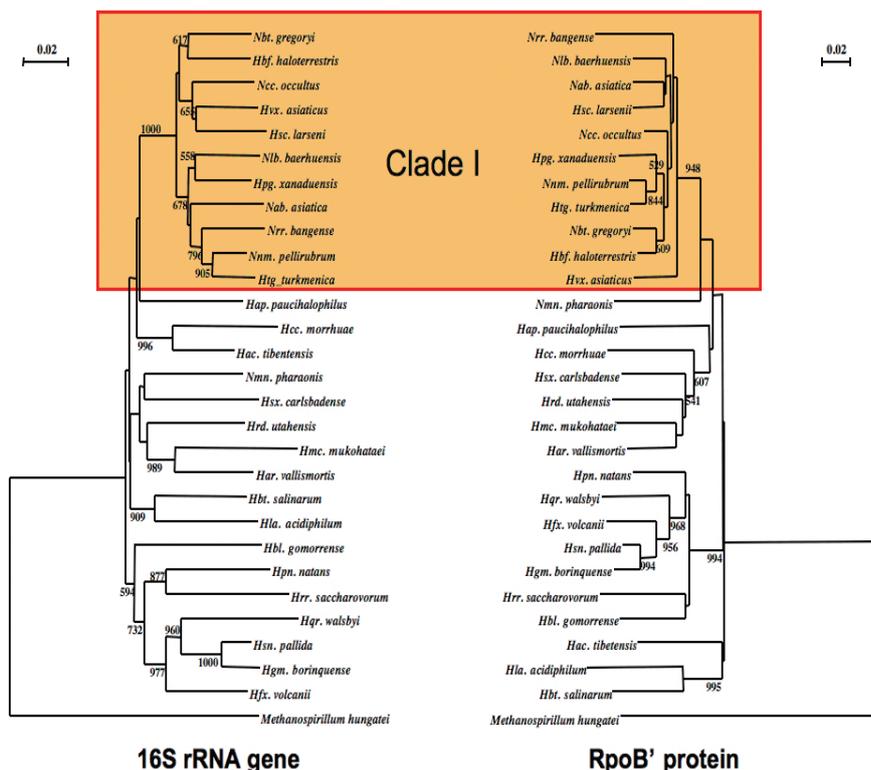


図 1. 16S rRNA 遺伝子塩基配列および RpoB' 推定アミノ酸配列を用いた近隣結合法による系統樹の比較。Clade I は 1998 年に McGenity らにより定義された Natrono Group のことであり、主に好アルカリ性の好塩性古細菌からなる。両系統樹において clade I の分岐におけるブートストラップ値は 90% 以上の高い値を示す。(Minegishi *et al.*, 2010)

配列 608-614 残基であった。特筆すべきはこれら塩基配列の違いが 5' 末端 (N 末端) 側に集中し、また 1,812 塩基にわたり 1 塩基の gap もなくアラインできたことである。近隣結合法および最尤法により構築した系統樹は 16S rRNA 遺伝子に基づくものと類似しているが 16S rRNA 遺伝子では明確に区別できない分類群が明瞭に分けられるなど、新たな分類指標として非常に有用であることが分かった。さらに我々は *rpoB'* 遺伝子の上流にある *rpoH*, *rpoB''* 遺伝子塩基配列の解析も終了している。

近年、16S rRNA 遺伝子のみならず複数の遺伝子を用い

る MLSA (Multilocus Sequence Analysis) がその系統分類関係を推定する上で重要になってきているが、一方で使用する遺伝子の種類・数、その長さなどによって影響されることがあり、各遺伝子の系統分類学的指標としての評価が今後重大な課題となるのは間違いないだろう。

今後も種の数が増え続けると予想される *Halobacteriaceae* 科において、*rpoB'* 遺伝子群の系統解析は 16S rRNA 遺伝子と共に解析することで *Halobacteriaceae* 科のより正確な系統分類につながると信じている。

JCM 株を使った研究

ダイオキシン分解プラスミド pCAR1 の宿主域の解析

新谷 政己 理研 BRC-JCM 基礎科学特別研究員

プラスミドは、接合伝達とよばれる現象によって細菌間を「行き来する」遺伝因子である。プラスミドはその移動に伴って宿主に新たな形質を与え、その表現型を大きく変える遺伝子の「運び手」であり、細菌の急速な進化・適応能を担うと考えられている。20 世紀の後半から、環境汚染の原因となる人為起源の化合物 (石油製品や有機金属など) に対して分解能を有する細菌が数多く単離され研究されてきたが、ある化合物に対する分解遺伝子群は異なる分解菌から得られたものであっても、互いに良く似ていることが多い。これはプラスミドによって分解遺伝子群が伝播することで生じると考えられている。また昨今深刻な院内感染を引き起こす多剤耐性菌の多剤耐性もプラスミドを介して出現する。従って (おそらくあまり知られていないが)、プラスミドは我々人類社会にも密接に関わってくる存在である。

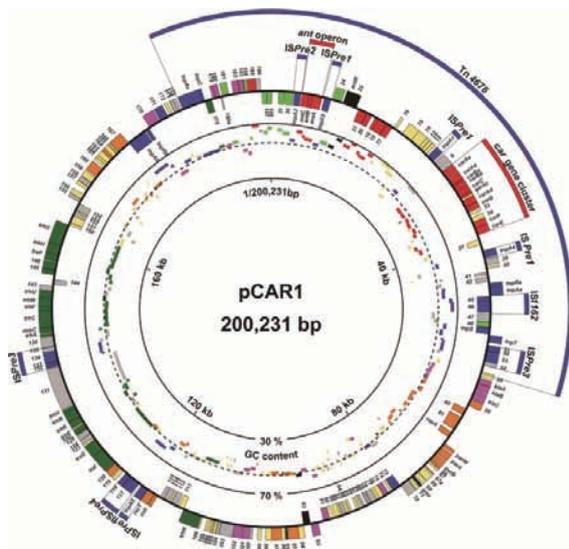


図 1. ダイオキシン分解プラスミド pCAR1。
(Maeda et al., 2003; Takahashi et al., 2009)

筆者は、内分泌攪乱物質としてよく知られたダイオキシンの分解遺伝子群を有するプラスミド pCAR1 について 10 年以上研究を行ってきた。pCAR1 は、2001 年に東京大学生物生産工学研究センターで単離されたダイオキシン分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株 (= JCM 16565) より発見された約 200 kb の環状プラスミドである (図 1)。プラスミド研究の歴史は非常に古いにもかかわらず、pCAR1 の全塩基配列を決定した 2003 年当時、pCAR1 上の遺伝子は既知のプラスミドのものと相同性が非常に低く、あまり例のない新規なプラスミドであることが判明した。筆者らは pCAR1 の複製・維持・接合伝達というプラスミドの基本機能について分子遺伝学的解析を行ったが、その後、本プラスミドは、分解遺伝子の運び手として重要なプラスミドグループの一つに含まれることが解った。そのため期せずして pCAR1 はそのグループの研究のいわば先駆けとなることができた。基本性質の中でも、pCAR1 がどのような細菌に接合伝達するのかという点は、分解プラスミドを利用した汚染環境の浄化を目指すにあたり、非常に興味深かった。そこで、pCAR1 を有する菌株とプラスミドを保持しない菌株の接合実験を行い、新たな接合伝達体が得られるかどうか実験することにした。pCAR1 を保持する元の宿主が *Pseudomonas* 属細菌だったことから、他の *Pseudomonas* 属細菌に pCAR1 が接合伝達するか、また *Pseudomonas* 属以外の細菌に接合伝達するのかを調べた。その際、当時東京大学分子細胞生物学研究所の IAM カルチャーセンター (微細藻類を除く IAM 株は現在 JCM に移管) から基準株を 9 株分譲して頂いた。接合実験の結果、pCAR1 が *Pseudomonas* 属細菌の複数種に接合伝達可能である一方、*Pseudomonas* 属以外の基準株には接合伝達しなかった。従って pCAR1 は *Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とすることが明らかになった。

その後筆者らは、pCAR1 の宿主が示す表現型は、同じ

Pseudomonas 属細菌であっても、宿主ごとに違ってくることを様々な観点から示してきた。そこで、pCAR1を有する菌株の種類を変えた場合、実際の環境中ではどのように「振る舞う」のか、その動態解析（汚染物質分解能・生残性・接合伝達性など）も行ってきた。その際、雑多な細菌を含む環境試料を用いた実験は、試料の採取時の季節・天候・時刻・場所などの違いによって構築する実験系の再現性が低いことが懸念された。そこで滅菌した人工土や環境水を用意し、*Pseudomonas* 属細菌7種、非*Pseudomonas* 属細菌3種の基準株（IAM株9株を含む）を接種した人工的なモデル環境を作製して動態モニタリングを行ったところ、再現性の高い良好な結果を得ることができた。詳細は割愛するが、本実験によってpCAR1を有する菌株がその分解

力を発揮するために適したモデル環境とpCAR1の宿主の組み合わせを明らかにできた。

また、本プラスミド保持菌株を、土壌や河川水といった環境試料中の細菌と接合させ、赤色蛍光タンパク質の発現を指標に接合伝達体の取得を試みた（図2）。その結果、*Pseudomonas* 属細菌の他に、微生物分類学的に目レベルで異なる *Stenotrophomonas* 属細菌を新たな宿主として得ることに成功した。不思議なことに、本菌株と類縁の *Stenotrophomonas maltophilia* JCM 1975^T を JCM より購入して、実験室内で pCAR1 の接合伝達実験を試みたが、接合伝達体を得ることはできなかった。この原因は未だ明らかになっていないが、接合の条件が異なること、環境試料中ではプラスミドが複数の細菌を経由して *Stenotrophomonas* 属細菌に伝達したこと等が考えられる。

筆者は現在、環境中におけるプラスミドの宿主域を解明するべく、理研の基礎科学特別研究員として JCM に所属している。これまでの研究にヒントを得て、大半は培養が難しいとされる環境細菌から、培養を介さない手法でプラスミドの接合伝達体を取得しようとしている。特に pCAR1 のように、実験室内では *Pseudomonas* 属細菌しか宿主としないプラスミドが、もしも培養できない細菌に接合伝達することが解れば非常に面白い。このような研究を、多様な細菌が保存され、各々に対する単離・分離法および菌体の同定法が整った JCM という世界有数のカルチャーコレクションで行うことができることは非常に心強い。いつの日かプラスミドの新宿主を（願わくは全く新しい細菌）を JCM に寄託できるようになればと強く思う。

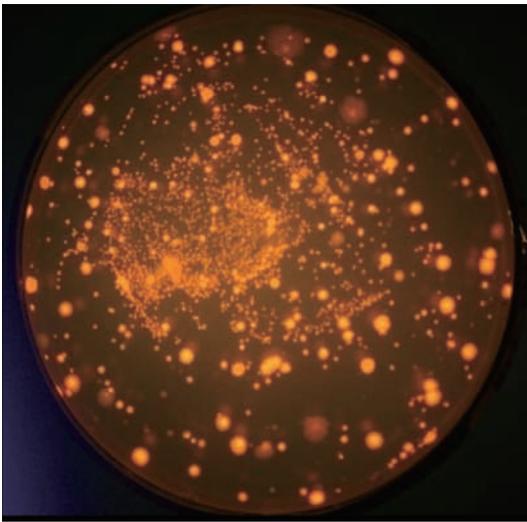


図2. pCAR1を環境細菌と接合伝達させた後平板培地に塗布した結果、pCAR1を有する菌株は赤色蛍光を示す。

JCMのリソース事業紹介（第3回 微生物株の品質検査）

このコーナーでは JCM におけるリソース事業がどのような手順で行われているのかをなるべく具体的に紹介致します。初回は菌株の受入れについて、前回は公式保存の手順について紹介しました。今回は、菌株の品質検査について紹介します。

現在、JCM には年間約 800 株の菌株が寄託され、3,000 株以上の菌株をユーザーへ提供しています。しかしこれまで寄託のために送られてくる菌株の数%において、誤った菌株であったり、コンタミ等の問題が判明しています。また、受託した菌株の維持管理には細心の注意を払っていますが、さらに菌株の確実性を確認する必要があります。このように信頼性のあるリソースを提供するためにはその品

質管理が大変重要になっています。JCM では菌株受入時やアンプルなど提供標品の補充時、クレーム対応時、あるいは提供数の多い菌株は優先的に菌株の品質検査を行っています。微生物の種類や状況に応じて実施する品質検査の項目は異なりますが、主に以下の品質検査を行います。

◆ コロニー観察、細胞形態観察

ほとんどの菌株に対し、コロニー形態もしくは細胞の形態観察を行います（図1）。寒天培地上で生育する菌株については、寒天培地上のコロニー形態を観察し、その形態が寄託者からの情報や文献情報と合致しているか、あるいは単一であるかなどの確認を行います。必要に応じ、培地の種類や培養温度などを変えた複数の培養条件で菌株を培

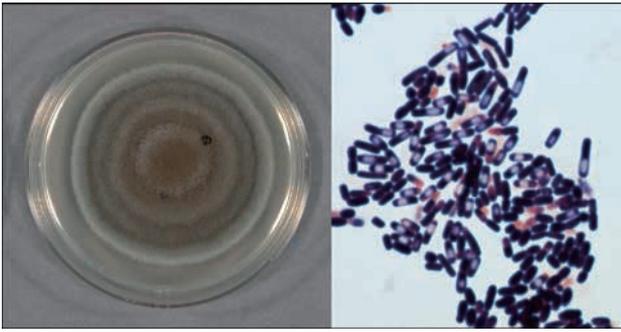


図 1. コロニー観察 (左) やグラム染色 (右) による菌株の確認。左は *Tetraploa* sp. JCM 14424、右は *Bacillus subtilis* JCM 20038。

養し、コンタミの有無を確認します。異なるコロニー形態が混在する場合や寒天培地上でコロニーを形成しない場合など、コロニー形態での判別が困難な場合には、顕微鏡下での細胞形態を観察します。状況に応じてグラム染色や DAPI 染色などを行い菌株の純度を確認します。

◆ 遺伝子解析

新規受入菌株やこれまでの保有株を含めて、細菌およびアーキアでは年間約 2,000 検体、真菌 (糸状菌、酵母) では約 400 検体に対して遺伝子解析を行っています。細菌、アーキアでは通常ダイレクトシークエンシングによる 16S rRNA 遺伝子解析を行っています。好塩性アーキアのように複数の異なる 16S rRNA 遺伝子コピーを持つ場合にはクローニングによって確認することもあります。また、異なるコロニー形態が混在する場合にはコロニーごとに遺伝子解析をすることがあります。さらに一部の細菌・アーキアに対しては、*hsp60* 遺伝子¹⁾などのハウスキープ遺伝子の解析も進めています。真菌では 18S rRNA 遺伝子、ITS 領域遺伝子、D1/D2 領域遺伝子の解析を順次進めています。現在、菌株が新規に寄託された際、ほとんどの菌株に対し遺伝子解析を進めており、寄託者からは塩基配列データを提供して頂いています。このデータは JCM で実施する遺伝子解析の結果と比較することで、寄託された菌株が微生物材料寄託申込書に記載されている微生物と同一であるか確認するために使用しています (図 2)。一方、遺伝子情報のない寄託菌株やこれまでの保有菌株についても順次、遺伝子解析を進めており、これらデータは以降の品質管理データとするともに菌株情報として公開していく予定です。また、理研 BRC では微生物ゲノム DNA の提供を行って

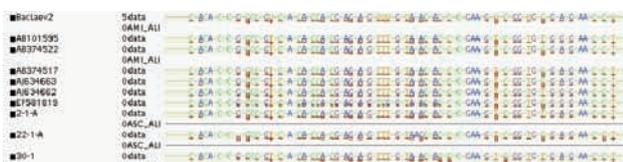


図 2. 近縁種との 16S rRNA 遺伝子塩基配列のアライメント。

ますが、これらについても、ゲノム DNA 抽出後、PCR 増幅とその遺伝子解析によってゲノム DNA の品質を確認し、提供を行っています。

¹⁾ M. Sakamoto *et al.* 2010. *J. Med. Microbiol.* 59: 1293.

◆ その他の試験

必要に応じて、生理・生化学性状や化学分類学性状の確認を行います。特に、上述のコロニー形態、細胞形態、遺伝子解析等では菌株の品質を確認できない場合や、菌株の履歴が古く遺伝子情報がない場合などに実施され、学術誌などに記述されている既存の情報と菌株の性状が一致するか確認されます。例としては、細菌同定キット (API 細菌同定キット (BioMerieux) や ID テスト (ニッスイ)) による表現性状の確認 (図 3) や、菌体内脂肪酸組成、イソプレノイドキノン組成、DNA G+C 含量などの機器分析を行う場合があります。また、一部の有用機能 (例えば難分解性物質の資化性) を有する菌株に対しては、その機能を保持しているか学術誌の情報に基づき、確認作業を行っています。



図 3. 同定キットによるグラム陰性好気性細菌の生理試験。

以上は JCM における品質検査ですが、寄託菌株の信頼性の確認にあたり JCM における受入検査だけでなく寄託者によるチェックも必要と判断した場合、あるいは JCM において確認することが難しい機能を保有する株などは、寄託者の方に提供標品の確認をお願いする場合があります。その際はどうかご協力いただけますようお願い致します。

JCM では菌株の信頼性に加えて菌株に関連する学術情報や培養情報などの情報付加を行い、より品質の高い菌株を提供できるよう努めています。

コラム

新綱 (New class) 細菌との出会い

陸上温泉郷のバイオマットから分離した *Ignavibacterium album* Mat9-16^T (= JCM 16511^T) は *Chlorobi* 門の綱レベル (*Ignavibacteria* 綱) で新規の細菌であるが、緑色光合成菌のみで構成されていた本菌群において唯一光合成能を有さず、従来の *Chlorobi* 門に属する細菌とは全く性質の異なる細菌であった (Iino *et al.* 2010, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1376)。

Mat9-16 株との出会いはサンプリングに誘われたことに始まるが、決して狙って分離できたわけではない。時間が余ったから採取目的とした熱水のそばにあったバイオマットもついでに採取し、せっかく採取したから寒天培地にバイオマットを塗抹して、何の気なしに3ヶ月間培養・観察を続けたら、新しくコロニーが形成されていることにたまたま気付いて、釣菌してみたのが Mat9-16 株であった。すなわち、偶然の連続によるものであった。一方で、その後は苦難の日々であった。この菌株は、何度、継代しても何故か小さく薄いコロニーを1つしか形成してくれなかったのである。16S rRNA 遺伝子塩基配列をかりうじて解析できたが、Mat9-16 株は類縁の微生物との相同性が82%しかなく、どのような微生物であるか全くわからなかった。新規性が極めて高いことは喜ばしいことであったが、そもそも「好気性菌か嫌気性菌か?」、「高温菌か中温菌か?」、「独立栄養性か従属栄養性か?」といった基礎情報すら得られなかったのである。正確な培養条件を把握できなかったため、全ての作業は直感だけが頼りであった。詳細を語ると話が尽きないため割愛させて頂くが、試行錯誤を重ねることで培養を増強することに成功し、バイオマット収集から実に1年半を経て、遂に Mat9-16 株の純粋分離に至った。

Mat9-16 株に限らず微生物の未知数が高まる程、教科書やマニュアルを見ても参考になる情報はなく、分離者の感性が多分に問われる。Mat9-16 株の純粋分離は運良く、勘が当たっただけかもしれない。しかし、日々の努力がなければ、運を引き寄せることすら叶わず、巡ってきた運も見逃していたであろう。全ては思いつきかもしれないが、それは経験あってこそ思いつくものである。知識や技術の習得は当然必要であるが、感性を常に磨き上げる努力も必要不可欠であり、日々の小さな努力や経験の積み重ねなしに未知の領域を開拓することはできないと切に感じる。分離作業は地道な作業かもしれないが、未知の微生物の培養が可能になれば、それは研究・開発の領域を拡張するリソースとなり、そこで得た経験は新たなリソース発掘のための知識・技術となる。新たなリソースを発掘することで、学識を深化させる一助になればと願う。とは言うものの、目前にいる菌株達は曲者揃いで、いつまでも頭を悩ませられるものである。

(飯野隆夫)



図1. 分離源のバイオマット。

図2. ネガティブ染色をした *I. album* Mat9-16 の TEM 写真。

編集後記

おかげさまで JCM も設立 30 周年を迎えることができました。設立の頃とは JCM の運営方式もコレクションを取り巻く社会情勢もだいぶ変わってきたように思います。微生物リソースを失うことなく次世代に渡していけるよう、どうか引き続きご支援の程お願い致します (TI)。

微生物リソースのみならず、30 年間で JCM に提供して頂いた知識や技術は膨大な量です。リソースの更なる充実、品質向上を目指すと共に、付随する情報も維持・向上できるよう努めたいと思います。研究の進歩に伴い、JCM のニーズも多様化しているかと思えます。それらにも応じられるよう一層の努力を行いたいと思います (TIN)。



JCM ニュースレター
No. 14
(2011年3月発行)

(編集発行)
独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 TEL: 048-467-9560 FAX: 048-462-4617
E-mail: inquiry@jcm.riken.jp URL: <http://www.jcm.riken.jp/>