

環境バイオテクノロジーの事業化

川原 恵一郎
(株) アース・ソリューション

環境バイオテクノロジーの研究そして技術開発は、健全な社会発展のため未来への投資といえます。一方、経済発展を遂げ成熟した社会が直面している環境汚染やそれに伴う健康被害の解決に対しては、低コストで高品質の環境バイオ技術サービスを安定的に提供できるビジネスが重要であると考えています。私たちはその活動に、アース・ソリューションを創業して以来10年間取り組んできました。事業テーマは、1) バイオディフェンス、2) バイオインフォマティクス、3) バイオリサイクル、4) バイオアッセイ、および5) バイオレメディエーションの5つの分野です。

それらの中でも、バイオアッセイでは、PCB（絶縁油中）、ダイオキシン類（排出ガス、ばいじん及び燃え殻）のELISA（酵素免疫測定法）法の技術開発とその事業化に取り組みました。それらは、免疫測定法通則（JIS）や公定法にも適合したものです。そして、現在は東南アジアへの販路開拓を行っています。

また、バイオレメディエーションについては、そのメリットを最大限活用して、他の物理化学的手法を組み合わせる実践的土壌浄化技術とそのノウハウを体系化し、ソフトレメディエーションと称して事業化しました。大規模な民間事業として、1ヘクタールを超える農薬汚染地を、原位置による嫌気分解と好気分解を組み合わせた方法で浄化した技術適用例があります。土着の微生物群を活性化させるバイオスティミュレーション法によるものです。

さらに最近では、東日本大震災の復興に向けて、植物系の放射能除染に対するバイオマス技術などを組み合わせた、新しいアプローチに関する研究・技術開発プロジェクトに協力しています。

今後も即戦略的な技術サービスの提供と、将来を豊かにするためのテーマへの研究・技術協力などを通して、環境保全の促進に取り組んでいきます。

環境バイオテクノロジーの事業化

川原 恵一郎
(株) アース・ソリューション

環境バイオテクノロジーの研究そして技術開発は、健全な社会発展のため未来への投資といえます。一方、経済発展を遂げ成熟した社会が直面している環境汚染やそれに伴う健康被害の解決に対しては、低コストで高品質の環境バイオ技術サービスを安定的に提供できるビジネスが重要であると考えています。私たちはその活動に、アース・ソリューションを創業して以来10年間取り組んできました。事業テーマは、1) バイオディフェンス、2) バイオインフォマティクス、3) バイオリサイクル、4) バイオアッセイ、および5) バイオレメディエーションの5つの分野です。

それらの中でも、バイオアッセイでは、PCB（絶縁油中）、ダイオキシン類（排出ガス、ばいじん及び燃え殻中）のELISA（酵素免疫測定法）法の技術開発とその事業化に取り組みました。それらは、免疫測定法通則（JIS）や公定法にも適合したものです。そして、現在は東南アジアへの販路開拓を行っています。

また、バイオレメディエーションについては、そのメリットを最大限活用して、他の物理化学的手法を組み合わせる実践的土壌浄化技術とそのノウハウを体系化し、ソフトレメディエーションと称して事業化しました。大規模な民間事業として、1ヘクタールを超える農業汚染地を、原位置による嫌気分解と好気分解を組み合わせた方法で浄化した技術適用例があります。土着の微生物群を活性化させるバイオスティミュレーション法によるものです。

さらに最近では、東日本大震災の復興に向けて、植物系の放射能除染に対するバイオマス技術などを組み合わせ、新しいアプローチに関する研究・技術開発プロジェクトに協力しています。

今後も即戦略的な技術サービスの提供と、将来を豊かにするためのテーマへの研究・技術協力などを通して、環境保全の促進に取り組んでいきます。

土壌細菌のジオキシゲナーゼを利用した天然資源の活用と環境浄化を目指して

笠井 大輔
長岡技科大・技学研究院

二原子酸素添加酵素（ジオキシゲナーゼ）は、好氣的条件下での土壌細菌の物質代謝において重要な役割を担う不可欠な酵素であり、植物資源や化石資源として自然界に存在する芳香族化合物の代謝や植物由来の高分子化合物の初発分解に関与する。これまでに演者は、環境汚染物質の浄化や未利用資源の利活用技術の開発を目指して、土壌細菌のジオキシゲナーゼの機能とその代謝酵素系に関する研究を行ってきた。本講演では、これまでに得た研究成果の中から、環境汚染物質として知られる塩素化エチレン類の浄化に有効なジオキシゲナーゼの機能解析に関する発表を行う。さらに、天然資源であるイソプレンゴムの有効活用を目指したジオキシゲナーゼによるゴム変換技術の開発に関する取り組みについて紹介する。

環境汚染物質の1つであるポリ塩化ビフェニルを分解できる*Rhodococcus jostii* RHA1株は、複数の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼを有しており、ビフェニルをはじめ、エチルベンゼンやフタル酸類等の芳香族化合物を代謝できる。近年の解析により、ビフェニルの水酸化に必須なビフェニルジオキシゲナーゼは、芳香族化合物のみならず揮発性有機化合物である塩素化エチレンの脱塩素化にも関与することが示された。また、本酵素をコードする遺伝子の転写は塩素化エチレン代謝時に誘導されることから、本遺伝子の転写に関わる転写制御系が塩素化エチレンに応答することが強く示唆された。

天然資源の有効活用に関しては、イソプレンゴムの廃棄物からの有価物生産を目指して、複数のグラム陽性菌とグラム陰性菌のゴム分解ジオキシゲナーゼの機能解明を行っている。これまでに演者らは、天然ゴムを唯一の炭素源・エネルギー源として生育するグラム陰性菌*Rhizobacter gummiphilus* NS21株を単離し、本株が有する2種のゴム分解ジオキシゲナーゼ遺伝子を特定した。各種機能解析から、ゴム分解ジオキシゲナーゼは、イソプレン鎖に酸素を添加し炭素結合を切断することでゴムを低分子化すること、それらをコードする遺伝子はNS21株のゴム低分子化に必須であること、そして両遺伝子の転写はゴム代謝時に誘導されることが明らかとなった。今後、これら酵素を利用した天然資源からの有価物生産系の構築が期待される。

コウヤクタケ型子実体形成種を主とする日本産ヒダナシタケ類の分類学的研究

前川 二太郎
鳥取大・農

材上にコウヤクタケ型の子実体を形成する菌類は、形態形質に基づく以前の分類体系においては担子菌門、ヒダナシタケ目、コウヤクタケ科に所属し、1981年時点で日本では8属27種の新種を含むおよそ110種が知られていた。本研究では、これらの報告種の基準（基礎）標本等を再調査するとともに、日本各地から新たに収集したコウヤクタケ型子実体形成種約5,000標本について、形態形質等に基づく分類を行なった。その結果、現在までに14属17新分類群及び66属187種の日本未記録種を報告した。特に、従来ほとんど未調査であったマングローブ林のコウヤクタケ類の調査を行ない、新属新種 *Haloaleurodiscus mangrovei*、新種 *Asterostroma macrospora* 及び日本未記録種5属6種を含む10属16種を見出した。これらの中で、*H. mangrovei* が、潮間帯に生育するハマザク口の枯幹及び枯枝に特異的に子実体を形成し、耐塩性を有するとともに、孔状白色腐朽を誘起することを明らかにした。また、本種が、既知の海生担子菌類とは異なる系統において、陸から海へ進出した種であることを示唆した。さらに、*Hyphoderma setigerum* 及び *Peniophorella praetermissa* について、詳細な形態形質の解析に加えて、分子系統解析及び交配能検定によって再検討を行った。その結果、*H. setigerum* は複合種であり、本分類群内に少なくとも9種の生物学的種が認められ、日本には本種類縁の *H. nudicephalum*、*H. subsetigerum* 及び未記載種1種が分布していることを明らかにした。*Peniophorella praetermissa* もまた複合種であり、本邦には *P. odontiaeformis*、*P. pertenuis* 及び少なくとも未記載種2種が分布していることを明らかにした。さらに、コウヤクタケ型子実体を形成する分類群以外に、藻類と共生し、ソウメンタケ型の子実体を形成する *Lepidostroma* 属種をアジア地域から初めて見出し、形態形質及び分子系統解析に基づき、日本産種を新種と認め、*L. asianum* として報告した。また、白色の子実体を形成する日本産 *Hydnum* 属種について形態形質と分子系統解析を行なった結果、新種 *H. minum* 及び日本未記録種 *H. albomagnum* を見出した。

分子生態学的手法を用いた植物共存微生物の群集構造解析法の確立

池永 誠
鹿児島大・農

分子生態学的手法を用いた植物共存微生物の群集構造解析においては、宿主植物由来のDNAが混入し、SSU rRNA遺伝子を標的とした細菌の群集構造解析では、植物オルガネラ（ミトコンドリア・プラスチド）のDNAが、ITS領域を標的とした糸状菌の群集構造解析では、主に宿主植物のDNAが過剰にPCR増幅される重大な問題が存在する。分子生態学的手法が植物共存微生物の群集構造解析に適用されて以来、この問題は度々指摘されてきたが、満足いく解決法は報告されて来なかった。本研究ではこの問題を解決するため、宿主植物に由来するDNAのPCR増幅を抑制する一方で、植物共存細菌または植物共存糸状菌のDNAを選択的に増幅する方法を開発し、分子生態学的手法を用いて迅速かつ簡便に植物共存微生物の群集構造を解析する方法を確立した。

本研究で確立した選択的PCR増幅法では、細菌・糸状菌解析いずれの場合もロックド核酸（LNA）を用いた。人工核酸のLNAはDNAに比べて熱安定性が高く、相補的な塩基にシビアである特徴を持つ。本研究ではこの特徴を応用し、細菌解析では、プライマーのアニーリング部位と競合する位置に、ミトコンドリアとプラスチド遺伝子に特異的なLNAオリゴをフォワード側とリバース側にそれぞれ設計し、PCRクランプ技術を適用する事によって、細菌遺伝子の選択的PCR増幅に成功した。本研究の結果、植物根だけでなく、種子や葉・茎等の細菌DNAの割合が植物オルガネラDNAに比べて低い試料でも、効果的に細菌遺伝子を選択的に増幅する事が可能となった他、種々の植物にも適用可能なLNAオリゴを設計し、本法を汎用性の高い解析法とした。

他方、ITS領域を標的とした糸状菌解析では、フォワード側に糸状菌に特異的なLNAプライマーを、リバース側に宿主植物に特異的なLNAオリゴを設計し、LNAプライマーとPCRクランプ技術の両方を適用する事により、植物共存糸状菌のDNAを効率的に増幅する事に成功した。宿主植物DNA/糸状菌DNA比の大きな葉や茎では、宿主植物DNAの増幅抑制がやや不十分であったものの、DGGE解析でバンドパターンを見る限り、群集構造解析が十分可能なレベルに達していると判断された。さらに本研究では、種々の植物にも適用可能なLNAオリゴを設計し、細菌解析と同様に糸状菌解析においても本法を汎用性の高い解析法とした。

「細胞内RNAウイルス多様性を解き明かす、網羅的dsRNAシーケンス手法」
A comprehensive dsRNA sequencing method illuminates intracellular RNA virus diversity

浦山俊一
JAMSTEC

生物の生態理解には、着目する環境において「何が、どれだけ」いるのかを把握することが基礎情報として重要な役割を果たす。ウイルスも生物学的存在として生態学的興味の対象となり得るが、光学的に捉えられないことやrRNAのような共通遺伝子を有していないことが、その場に「何が、どれだけ」いるのかという全体像の把握を困難にしていた。そんな中、近年のシーケンス技術の発達はこの欠落を埋めることに大きな役割を果たしており、特に宿主細胞を飛び出して環境中で浮遊しているウイルスが有する膨大な遺伝的多様性が明らかにされてきた。しかし、宿主細胞内に存在しているウイルスに関しては、技術的な制限により十分な解析が行えていなかった。そこで本研究では、細胞内の全ウイルスは捉えられないものの、非レトロRNAウイルスを網羅的かつ高効率に探索するFLDS法を確立した。本技術は細胞内の長鎖dsRNA（dsRNAウイルスゲノムおよびssRNAウイルスの複製中間体に由来）を選択的かつ高品質にシーケンスするためのライブラリ構築手法である。本講演ではFLDS法の紹介に加え、これを基盤として現在進めている研究についても、その一部を紹介したい。

微細藻類の系統分類研究に基づくデータベース構築および研究基盤の高度化

河地 正伸
国環研・生物セ

1998年に国立環境研究所に入所して以来、微生物系統保存施設の藻類カルチャーコレクションの担当者の一人として、運営に携わるとともに、コレクションに関わる研究を続けてきた。大学院時代から、南極観測隊や海洋バイオテクノロジー研究所を経て、現在に至るまで、一貫して藻類に関わられたことに感謝している。入所したての頃の思い出の一つにコレクションの手作りホームページがある。修正や更新を即座に行えて、画像なども容易に扱えるホームページは、コレクションの情報提供の格好の場と考え、紆余曲折の末、保存株管理データベースの一部をホームページに出力する形での運用に落ち着いた。当施設は、環境研究に必要な藻類保存株の収集・保存・提供を目的に1983年に開設され、2002年以降は文科省NBRPの藻類リソース中核として、ライフサイエンスに重要なモデル生物、ゲノム解析株等の収集、付加情報整備に取り組んできた。付加情報の一つ、DNAバーコード情報や遺伝子情報の集積と情報公開の過程では、必要に応じて種～高次分類群各レベルでの改訂を行ってきた。新種や新規高次分類群の発見も少なくない。分類名の変更は利用者の混乱を招くことになるが、コレクションの株番号は不変であり、分類名の履歴をきちんと整備することで、混乱は避けられるだろう。分類名を保証するDNAバーコード情報の整備は、現在も重要なルーティンワークの一つとなっている。国際植物命名規約（現 国際藻類・菌類・植物命名規約）に基づいて多くの種が記載されてきた藻類の場合、タイプ株やコレクションへの寄託は必須ではない。藻類の一群として扱われてきたシアノバクテリアも同様で、その分類は近年の分子系統の研究結果との齟齬が多く、混沌としている。抜本的な分類体系の見直しや国際細菌命名規約に準ずるあるいは完全な移行が必要であろう。その時にはバクテリア同様、藻類コレクションの果たす役割は更に重要なものとなる。難凍結保存株の凍結法の開発や脆弱種の輸送問題、未知・難培養性種のコレクション化、名古屋議定書の国内措置施行に対応するための体制整備等、まだまだ課題は山積している。研究基盤としての高度化を図るために、自らもコレクションの利用者として研究コミュニティと関わりながら研究を展開しつつ、利用者の視点で新しい研究材料としての保存株や最新の情報をコレクションに還元することを継続したい。

卵菌類, 特に*Pythium*属菌の分子系統解析に基づく分類研究と安定的長期保存方法の開発

埋橋 志穂美
農研機構・遺伝資源センター

卵菌類に含まれる*Pythium*属菌は、ストラメノパイル生物群に属し、真菌類とは系統学的に大きく異なる生物である。近年、遺伝子解析の手法が分類や系統進化の研究に導入され、これまでの形態的特徴に基づく分類と、遺伝子解析結果との相関について様々な問題が指摘されている。これまでに、従来型の形態等の表現形質に加え、分子系統学的手法から本属の分類学的検討を行い、本属を5属に分割する新分類体系を提案した。この5属には、系統学的に高い支持が得られる属もあるが、現時点での分子系統学的情報では十分な系統関係が示されない属もあり、解析種数や解析領域について更なる検討が必要と考えられる。また、本菌群の培養株は凍結保存で死滅しやすく、以前から長期安定的な保存法の確立が難しい材料として扱われてきた。特に微生物保存施設においては、貴重な遺伝資源を維持するため、従来型の継代培養等による保存も行われている現状もあり、本菌群の効率的かつ安定的長期保存法の確立が急務である。本研究では、分子系統学的な支持の低い属を含む従来の(広義) *Pythium*属について、分子系統学的解析に基づく分類学的研究を行うため、農研機構遺伝資源センターのジーンバンクに保存されている800点以上の広義*Pythium*属菌を対象に研究を行った。まず、バーコード遺伝子領域である*Cox1*領域の塩基配列を明らかにし、各菌株の表示学名の検証を行うとともに、同塩基配列情報を蓄積し、系統・分類学的検討のためのデータとした。その結果、これまでに、ジーンバンクのほぼ全ての保存菌株について*Cox1*領域の塩基配列を決定し、データベースにて公開するとともに、同領域および必要に応じてITS塩基配列や形態情報に基づいて105株の学名を変更、さらに最新の分類体系に基づき46件の学名更新を行い、登録菌株の学名の検証、整備を行った。また、保存株のうち特に凍結保存での生残率の低い菌株を用いて長期保存法の開発を試みた。ここでは、滅菌処理したアブラナ科種子へ*Pythium*属菌を侵入・定着させ、凍結保護処理を行った後、液体窒素で急速冷却する新規の方法を検討した。その結果、供試菌株でこれまでほぼ0%だった生残率は50~80%以上に向上し、菌株によっては100%近くの生残率を達成した。今後更なる検討を重ね、汎用性の高い超低温保存法を確立し、ジーンバンク事業への活用を目指したい。