

東日本大震災で被害を受けた 微生物株保存機関への支援を受けて

宮崎 厚

宮城県石巻市南境地区の旧北上川沿いに位置している石巻専修大学は、3.11東日本大震災に見舞われたものの蛇行した川の流が幸いしたのか奇跡的に津波の直接波および浸水を免れた。また、さらに4.7余震を受けても建物本体は専門業者による検査の結果、一部破損・ひび割れに留まり大きな被害は皆無だった¹⁾。このような状況であったため2号館と呼ぶ3階建て建物1階の実験室にある超低温槽に-80°Cで凍結保存されていたヒゲカビ保存菌株コレクション（登録菌株保存機関：石巻専修大学理工学部基礎理学科）は流失することはなかったが、ライフラインの分断により11日間にわたる電源の供給停止の状態を余儀なくされた²⁾。大震災および津波被害に際し、公益財団法人発酵研究所が日本微生物資源学会に登録する菌株保存機関への支援を表明し、同学会に申請取りまとめを依頼したところ、今回紹介する本コレクションがその支援を受けることになり、全株の培養試験が進行している。

今回は機会を得たので、ヒゲカビ小史として保存菌株コレクションの誕生・日本に持ち込まれてからの変遷、保存菌株の特徴と利用、震災の被害を受けた保存菌株の現状を紹介したい。

ヒゲカビ保存菌株コレクションの来歴³⁾

ヒゲカビ (*Phycomyces* 属) は接合菌類 [亜門・綱] (現在この分類群は解体されてケカビ亜門が該当) に属しており、いわゆる“カビ”の中で特に大型の種として知られる。菌糸マット上に直径約100 μm、高さ10 cm以上にもなる直立無分枝の胞子囊柄を形成し、その頂端に胞子囊 (無性生殖) を一つつける (図1)。胞子囊柄は隔壁のない単細胞性の多核体 (ケノサイト) であるが、光や重力、気流などに敏感に応答 (屈性) することから、「刺激受容—情報伝達—応答反応」モデルの一つとして多くの研究に用いられてきた^{4,5)}。また、+と-の性を持ち、一連のダイナミックな形態形成を伴う接合 (有性生殖) を行う⁶⁾。

ヒゲカビを最初に記載したのはAgardhであり、今から196年前の1817年のことである。フィンランドにある油田の壁や木材の上に生育しているヒゲカビを見つけ

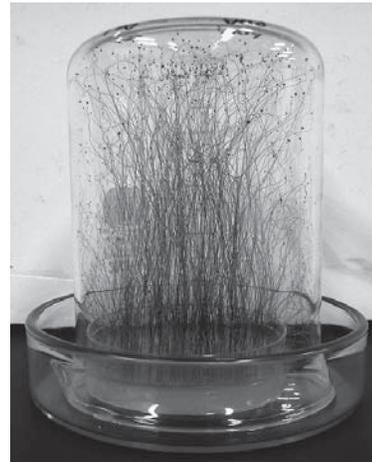


図1. チアミン添加PDAYC培地で5日間培養した野生株NRRL1555(-)。菌株を覆っているのは高さ約9 cmの200 mLビーカー。

た彼は、緑がかった巨大な胞子囊柄を“カビ”と思わずに“緑藻”の1種として*Ulva nitens*と命名した。1823年になり、ドイツのKunzeが似た環境から同じような“緑藻”を見つけて“カビ”であることを明らかにし、*Phycomyces* 属を与えた。その後、幾人かの研究者により改名があったが、1873年にvan Tieghem & Le Monnierにより*Phycomyces nitens*と再改名された。1925年にBurgeffは、それまで各地で使用されていたいわゆる*P. nitens*を再検討し*P. nitens* Kunzeと*Phycomyces blakesleeanus* Burgeffに分類した。長卵形の胞子の長径は、前者が15~30 μm、後者が8~12 μmであり、両者の識別は今では容易に行える。他に球形の胞子をもつ*Phycomyces microsporus* van Tieghemの記載などがあるが、少なくともその存在は日本では知られていない。

1904年Leonianが、Blakesleeの収集株をNRRLに移管し、続いてカリフォルニア工科大学のDelbrückの研究室でそれらが積極的に利用される過程で多数の変異株が生み出されることにより、野生株に加えて種々の変異株およびそれら間の交配で得られた株群からなるヒゲカビ保存菌株コレクションが完成した。1977年Delbrückの定年退職に際し、Delbrückラボでのポストクを経て

山形大学に職を得ていた大瀧保先生の申請に対して文部省（当時）より系統維持費の支給が決まり、それまでに収集および作出されたすべての菌株コレクションが山形大学大瀧ラボに移管された（734株）。現在のコレクションの8割は*P. blakesleeanus* NRRL1555（-）株由来の変異株が占め、本コレクションの大きな特徴となっている。特定の株が利用された原点は、ファージの研究で培ったDelbrückの研究手腕に求めることができる。NRRL1555（-）株を標準野生株系統とすることで、その材料から生み出される研究成果に対して世界中で比較検討や追試を行うことが可能となったからである。その後、コレクションは大瀧ラボとともに東北大学遺伝生態研究センター（当時）に移り、大瀧先生の定年退職後しばらく東北大学に保管されていたが、2007年正式に石巻専修大学に移管され現在に至っている。この折、東北大学保管時に用いていた機関略号IGE（Institute of Genetic Ecology）からISU（Ishinomaki Senshu University）への変更手続きが行われた。研究の進展や途中で数回経験したコレクションの移動を経て、2011年3月11日現在776株が-80°Cで凍結保存されていた。

菌株コレクションの特徴と利用

本コレクションの特徴である変異株には大きく分けて、運動反応変異株、栄養要求性変異株、薬剤耐性変異株、形態的変異株、 β -カロテン合成変異株が存在する。光屈性変異株（運動反応変異株）や β -カロテン合成変異株の解析により、そのプロセスに関わる遺伝子数の推定や変異の生理特性が明らかにされ⁷⁾、また、胞子嚢直下膨潤変異株（形態的変異株）の解析により、光屈性における分光的作用の重要性が明らかにされてきた⁴⁾。しかし、このような多彩な変異株がありながらその利用は十分でないのが現状である。生物学的解析の要になる遺伝子工学的手法のうち未だに有効な形質転換系が開発されていない点や産業的利用への活路が見いだされていない点などが新たな研究者の参入の障害になっていると思われる。

ヒゲカビ研究の世界でもゲノム情報を解読するプロジェクトが発足し、2007年1月にはNRRL1555（-）株ゲノムのデータベース（DB）がJoint Genome Instituteより公開された。これに前後して、ヒゲカビ研究者の誰もが知りたかった大きな成果として、光屈性変異の原因遺伝子および性決定遺伝子座の同定が報告された。前者の研究で本コレクションの変異株が利用されたことは意義深い。遺伝子情報を直接扱えるようにするゲノムDBの公開により、ヒゲカビにおける不十分な研究手法を補

える可能性がでてきた。新たな研究者の参入の呼び水となることを期待したい。

菌株コレクションの培養試験の現状

菌株を保存している-80°Cの超低温槽やクリーンベンチおよび培養スペースは大学の共用実験室内にあること、またヒゲカビの最適培養には適度な照明と20°C前後の温度管理が必要とされることから、現状ではスペース的に限られた環境状況での培養試験となっている。培養にはヒゲカビが要求性を持つチアミンを添加したPDAYC培地（市販品のPDA培地に酵母エキスとカセトン¹を1g/l補強）を用いている。保存には、ねじ口キャップ付き5mlバイアル瓶に2ml斜面スラントを作製し、菌株を植えて4~7日間培養してからキャップを締める方法を用い同じ菌株6株を保存している（図2）。培養試験は、保存されていたストック株のうち保存時期が早い物（形質変化がより少ないと予想されるため）から培養を開始し、通常成長と判断した場合にはその培養プレートから新たなストック培養（保存用培養）を作製する方法により行っている。保存菌株776株のうち、野生株62株では1株の欠失が確認された。8株において初回培養で成長が見られなかったが別ストックからの成長を確認できたため、結果的には61株で新たなストック培養を作製した。ただ、うち3株は形態的変異を持つ野生株の可能性がある。変異株群のA番号株173株では、1株が記載変異形質（色素合成）を示さなかったため破棄した。172株のストック培養（1次）は完了している（図3）。現在B番号株での培養試験を行っており、順次継続していく予定である。現在は完全培地での試験であるため、変異形質のうち色素合成や形態的変異は確認できるが、将来的には薬剤耐性や栄養要求性（図4）などの試験（2次）が必要と考えている。



図2. バイアル瓶に作製したスラント培地に成長した保存菌株。一つの株に対して同じものを6本作製。



図3. A番号株の *car*変異株 (カロテン合成異常変異株). 野生株はβ-カロテンを合成し蓄積する. 左から白色変異株 (フィトエン蓄積が予想), 赤色変異株 (リコペン蓄積), 濃黄色変異株 (β-カロテン高蓄積).

幸運にも流失を免れた本コレクションは, これまでに複数回の移動を余儀なくされてきている. 現在進行中の全株培養試験は, 今までに蓄積した保存菌株上および書類上の不具合を改めて検討する機会になっていると考えている. そのきっかけを与えていただいた今回の支援に対し, 公益財団法人発酵研究所に改めて感謝申し上げます.

文 献

1) 紀要編集委員会編: 東日本大震災石巻専修大学報告書, p.38, 石巻専修大学 (2012).

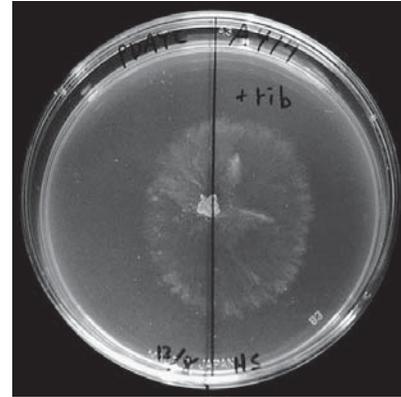


図4. *ribBpurC* (リボフラビン要求性・プリン塩基合成異常変異株). 培養プレートの右半分にリボフラビンを塗布するとその拡散濃度に依存した成長を示す.

2) 宮崎 厚: 日本菌学会ニュースレター (9月), p.1 (2011).
 3) 宮崎 厚: 日本微生物資源学会誌, **24**, 153 (2008).
 4) 大瀧 保: 日菌報, **41**, 1 (2000).
 5) 大瀧 保ら: 日菌報, **35**, 111 (1994).
 6) 大瀧 保ら: *Bull JFCC*, **3**, 20 (1987).
 7) Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E. D (eds.): *PHYCOMYCETES*, Cold Spring Harvor Lab (1987).