

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」領域)

生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための

国際標準の微生物資源センターの構築

(インドネシア共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者:鈴木 健一郎

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センター 技監

<平成 22 度採択>

1. プロジェクト全体の実施概要

インドネシアは熱帯に多くの島々を有し、その生物多様性は世界第2位といわれている。しかし、自然破壊が進み、希少な動植物の多様性の滅失への危機感が高まる中、生物多様性条約により自国の生物資源の管理は国家的戦略となっている。微生物においては、その豊富な資源を取得して保存し、活用をはかるメカニズムの構築は急務である。LIPI は、インドネシアの基礎科学研究の中核機関として、日本政府無償資金協力により生物学研究センターを建設し、植物学部門と動物学部門は、それぞれ国際的に高い知名度を得ており、残る微生物部門についても、本事業を通して国際的な研究センターとなることが期待されている。

本事業の目的は、インドネシアの微生物資源の多様性を利用して有用微生物を探索、分離し、それを的確な方法と設備で保存・管理する保存機関を LIPI 生物学研究センターに設立し、生物多様性条約 (CBD) の精神に則った提供体制を整備することでインドネシアの微生物資源を活用した研究の推進と専門家の育成、産業の振興に寄与することである。そして①健康、環境に有用な微生物の探索、②多様な微生物の生態、分類学的研究を行うとともに、有用微生物の③持続可能な農業への適用、④食品産業のための応用研究を実施し、⑤得られた微生物のデータベースを構築して公開し、利用促進を図る。

4つの研究課題「LIPI 微生物資源センター設立・運営のための資源管理」、「新規有用微生物の探索と生態学的研究」、「農業利用および環境・生態系保全に有用な微生物の分離と応用」、「家畜プロバイオティクスの分離・機能開発と応用」に分かれて、実験に必要な機器の設置、インドネシア国内の多様な自然環境、あるいは耕作地、森林、家畜などから試料を採集し、微生物株の分離を行い、多くの微生物株が分離され、それらの分類学的特徴づけと機能の評価が進められている。中核的微生物資源センターに必要な機材の設置、運転も進み、微生物データベースはプロトタイプにモデルデータを実装した。プロジェクト内での微生物株の保存と国際移転のためのスキームを確立し、さらに成果を発表するための微生物株の両代表機関の公的コレクションへの寄託の承認プロセスを確立した。生物多様性条約 (CBD) の精神に則った恒久的な微生物資源センターとして、持続可能な利用のための微生物管理移転文書と様式を整備した。インドネシアより、LIPI の長官と国土開発庁 (BAPPENAS) の次官の日本への招聘を通じ、微生物資源センターの重要性を訴えた結果、インドネシア LIPI に微生物資源センター施設の建設が認められ、平成 25 年度末に完成した。2013 年 11 月に中間評価が行われ、目標と経過について評価されたが、より有用な微生物資源の取得を通じ、その利用促進の強化が求められた。残された 2 年で取得された微生物のコレクションへの保存と論文発表を推進する予定である。

2. 研究グループ別の実施内容

2.1 【研究題目1】 LIPI 微生物資源センター設立・運営のための資源管理 ((独) 製品評価技術基盤機構)

① 研究のねらい

インドネシアに特徴的な有用微生物資源を LIPI 微生物資源センターにおいて高品質で保存・管理し、分譲を行う事業を整備する。保有微生物株のカタログデータベースを構築することによって、利用者に適切な情報を提供するとともに、インドネシアのコレクションネットワーク (FORKOMIKRO) の中核として、インドネシア国内のコレクションの微生物株に関する情報を統合し、インドネシア微生物インベントリーの基盤を作る。LIPI 微生物資源センターが、国際標準を満たし、インドネシアを代表する微生物資源センターとして機能し、インドネシア原産の微生物資源が国内外で活用されるように国家によって承認された資源管理体

制を持つことを目標とする。

インドネシア国内をはじめ、東南アジア圏内を対象に、講習会や研究セミナーなどを開催し、微生物研究者や他の保存機関に対し、微生物の適切な取り扱いに関する啓蒙や指導を行うとともに、先進国の研究者とも連携してインドネシアの専門家育成の拠点となることを目指す。

②研究実施方法

微生物資源センターの活動に必要な設備・器具を整備する。ISO9001 (品質管理システムの規格) の認証制度及び、OECD の生物資源センター (BRC) のベストプラクティスガイドラインなどを考慮し、微生物資源センターを国際標準の微生物資源センターとするための段階的改善計画を策定する。最新の微生物学の動向に従って、コレクションの運営方針、技術管理、微生物学研究とその技術プログラムを改良する。インドネシアの法令と規則を順守した微生物資源センターのマネジメントシステムを構築する。プロジェクトで実施された研究と文献情報に基づき、微生物資源センターに保存されている微生物株のデータベースを開発し、充実させる。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(1) 微生物資源の保存管理については、RCB-LIPI に多数のアンフルを同時に作製できる 160 本仕様の多岐管を備えた凍結乾燥機を導入し、L 乾燥アンフル作製のための条件設定をおこなった。アンフルの準備、菌液の調製から凍結乾燥機への接続、乾燥、ガスバーナーによるアンフルの熔封までの手順を技術スタッフ 5 名に研修した。それに基づきインドネシア側で自ら登録株のアンフル作製を行い、経験を積んでいる。InaCC への登録と連携して保存標品を保管する体制について研修した。微生物株の受託から分譲までの各段階において必要な文書について昨年の版を再検討して改訂版を作成し最終版とした。新規微生物株の受入れのための業務について研修を行い、微生物株寄託申込書(アクセションフォーム)と微生物株を受け入れる際の手順、保存標品の作製と管理のためのフローを作成した。分譲の受付についても手順を説明した。平成 25 年度に新たに受託証明書の様式を決定した。LIPI のプロジェクトリーダー(生物学研究センター長)およびプロジェクトマネージャーが来日し、NBRC の業務を見学し、LIPI における体制と人的配置について協議した。新建屋への移転に合わせて、組織の再編をするとのことである。ISO9001 に基づく手順書の概要について NBRC を参考に研修を行い、RCB-LIPI において品質管理システムのための手順書を作成して ISO9001 の審査を受けた結果、2014 年 2 月に合格した。

(2) データベース構築については、平成 24 年度に LIPI IT チーム代表者が来日して NBRC のデータベースにおけるデータの取り扱いの研修を行った。動物標本、植物標本を管理するシステム構築を行った経験を生かし、LIPI IT チームにより微生物株の管理を行うシステムの試作を行った。試作したシステムに対して、NBRC 担当者にて評価を行い、変更を要する部分に対してデータ管理のポイントや考え方を指導すると共に改修の助言を行った。これを数回繰り返し行うことにより、微生物株の内部管理システムのプロトタイプを完成させた。さらに、微生物株の内部管理システムに蓄積された微生物株情報を公開するシステムの構築にも着手した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

(1) 微生物資源の保存管理について、微生物資源センターの業務のフローと管理すべき情報、それらを実施するための文書様式についてノウハウが移転された。さらに 2012 年度に着任したインドネシア側のプロ

ジェクトリーダーをマネージャーとともに NBRC に招聘し、事業全体の運営、設備の維持管理について説明した。インドネシアでは、「ISO9001 に基づく品質管理システムとその運営と手順書について」と、「InaCC への微生物株の登録の手順について」の2件のセミナーを行った。

(2) データベース構築については、平成 24 年度に NBRC でデータベースの構成と操作法について研修を行い、インドネシアでは NBRC の紹介を含む微生物資源センターの体制と業務に関するセミナーを開催し、データベース開発の体制と今後の計画について意見交換を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

LIPIによる微生物保存施設の建築計画が、プロジェクト開始後インドネシア政府、LIPI 幹部の来日で具体化した。2014 年 3 月現在、建物は完成したがインフラが未整備で、機器や保存微生物株の移転と新施設での事業開始は平成 26 年度の最重要課題である。各室の配置と機器類の設置について、日本側の経験に基づいて助言した。中間評価の提言に基づき、作業マニュアルの作成を開始することになったが、ISO 9001の認証を取得したので、その手順書の構成に基づく形で順次作成していく。

2. 2 【研究題目2】 新規有用微生物の探索と生態学的研究 ((独)製品評価技術基盤機構)

①研究のねらい

人間の生活の向上や食品生産、農業、環境修復に有用なインドネシア原産の新規微生物資源を収集し保管する。

②研究実施方法

対象とする微生物を 5 つのグループ(1. 糸状菌、2. 酵母、3. 放線菌、4. 細菌、アーキア及びバクテリオファージ、5. 微細藻類)に別けて、グループ毎のチームを結成し、基本的にはチーム毎に協力して計画の策定や人材育成を行うこととしている。

今年度のサンプリングについては、研究題目2全員でサンプリングの情報を共有し、できる限り時期や場所を調整して効率よくサンプリングを実施した。

チーム毎に複数の小テーマを設定し、それぞれのテーマごとに研究目的と計画を作成し、研究活動を実施した。研究題目2の中に小テーマを複数設定することで、インドネシアの多様な微生物資源を効率良く収集することができ、分類群毎に適切な同定手法により同定が行われ、テーマ毎のインドネシア研究員に対し必要な人材育成を実施することができた。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

分離はおおむね順調で、現在はそれぞれの微生物群の特徴について分析しているところである。一部、土壌糸状菌、五単糖発酵酵母、海洋性放線菌、バイオレメディエーション用細菌については、目標を達していないことから、平成 26 年度も引き続き分離を行う予定である。これまで分離された微生物は長期保存に供しており、有用性や新規性が見いだされた株は随時 InaCC と NBRC への登録を開始している。

RS2-1(糸状菌)

抗マラリア薬の原材料として知られるキナの内生菌および関連菌の探索および保存作業は終了し、得ら

れた菌の分類学的所属を形態および分子系統学的解析に基づき解析中である。特に、内生菌として分離された521株を対象に、分離された菌種と植物組織および調査地域との関連性など、その生態的特性についても比較検討中である。

土壌生息性鞭毛菌の探索については、本年度から実施し、ジョグジャカルタ近郊のサトウキビ、キャッサバおよびイネ栽培地の土壌試料を採取し、釣餌法により卵菌(*Pythium*、*Achlya* 属菌他)を約100株分離した。長期保存を完了し、現在同定中である。

RS2-2(酵母)

4つの小テーマを課題とし実施している。油脂生産酵母については、分離と簡易同定は終了し、今年度は新規微生物の提唱のための同定実験を行った。現在、網羅的に油脂生産能を調べる準備を行っている。五単糖発酵酵母及び資化性酵母については、スマトラ島にてキクイムシの坑道や朽木からの分離を試みた。発酵酵母は見つからなかったが五単糖を資化する新規酵母を分離することができた。発酵食品酵母についても、スマトラ島の発酵食品から126株の酵母菌を分離し、特定の乳発酵食品から同一の新種が発見されており、それについて分類学的性質を調べているところである。植物等からの自然界酵母からは多くの新種が発見されており、そのうち2種について、新種提唱のための解析が終了した。

RS2-3(放線菌&バイオレメディエーション用細菌)

植物内生放線菌については、インドネシア研究者を中心に、分離を試みているところである。

海洋性放線菌については、Pari 島その他2島でサンプリングし、新種と思われる株を56株分離した。1属1種の希少放線菌である *Serinibacter* 属と *Sediminihabitans* 属に近縁な新種候補株3株を対象に分類研究を実施し、*Serinibacter* 属分離株については新種として論文を作成しておりまもなく投稿予定である。*Sediminihabitans* 属分離株についてもほぼ実験は終了しており、新種として論文を作成する予定である。本研究を通して、海洋性放線菌の分離方法をインドネシア研究者に指導した。

一般土壌放線菌では、インドネシア研究者が保有していた未同定放線菌のうち、*Actinoplanes* sp.、*Cryptosporangium* sp.、*Saccharopolyspora* sp.、*Nonomuraea* sp.、*Kribbella* sp.、*Saccharothrix* sp.を用いて、分類学的研究に必要な、化学分類学的解析、生理生化学的性状、培養性状、DNA-DNA 相同性試験の手法をインドネシア研究者に指導し、新種発表の準備を行った。

バイオレメディエーション用細菌については、嫌気性細菌を1株分離し保存した。また、嫌気性細菌の取り扱い方法をインドネシア研究者に指導した。

抗腫瘍活性を有する *Streptomyces* sp. 2株について全ゲノム解析を開始した。現在解析中である。

RS2-4(乳酸菌、根粒菌、アーキア、ファージ)

昨年度のジャワ島での調査に追加して、本年度はバリ島およびスマトラ島の発酵食品を調査し、そこから乳酸菌の分離を試みた。2012年、2013年度に分離した乳酸菌の簡易同定がほぼ終了した。乳製品への微生物の応用を考え、酸生成能についても網羅的に解析した。さらに、プロテアーゼ活性とアミラーゼ活性を網羅的に解析し、分離した菌株への情報付加を行った。今後、乳酸菌が有する抗細菌および抗菌活性について解析を進める予定である。

アーキアについては、本年度は、高度好塩性古細菌及びメタン生成古細菌の分離と培養を試みた。アーキアについては、その扱いをインドネシアに技術移転することが主たる目的であることから、集積培養、

純水培養、保存について共同で実験を行い、あらゆるアーキアの取り扱い方法について指導した。菌株収集として、本年度は東ジャワ及びバリ島でサンプリングを実施し、得られたサンプルから高度好塩古細菌の分離を精力的に行った結果、200 株程度の菌株を獲得した。簡易同定の結果、これら分離株は 17 属 31 種の既知種と 16 の新規系統群に分類された。今後、いくつかの新規系統群について、分類学的研究を進めていく予定である。

ファージについては、2012 年 7 月ジャワ島西部、2013 年 9 月、バリ島で収集した試料より、乳酸菌ファージと大腸菌ファージの分離を試みた。この結果、現在までに、大腸菌ファージが 5 株を取得した。今後はゲノム配列を解読することで、獲得したファージの詳細な分類学的研究を実施する予定である。

RS2-5(藻類)

ワカトビ諸島にてサンプリングを行い、サンプル採取方法について技術指導を行った。採集活動後は LIPI 研究所にて、サンプルの処理方法について技術指導を行った。

2011 年と 2012 年に採取した藻類株について、形態観察及び 18S rDNA による同定、ナイルレッド染色法による脂質生産能の推定、培養温度及び pH における増殖能について解析した。これらは、インドネシア研究者と共同で実施した。

現在、有用脂質生産藻類候補株 5 株と有用色素産生候補株 1 株、水素産生藻類株 1 株、環境修復利用途候補株 3 株の各種特徴を有する微細藻類株が見いだされている。

色素産生藻類の色素が有する抗酸化能に着目し、抗酸化能を網羅的に調べるための実験系の構築を開始した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

糸状菌サブグループでは、分子系統解析の指導、生態学的解析の指導、論文執筆指導、釣餌法による卵菌の分離について指導した。

酵母菌サブグループでは、電子顕微鏡観察、および分子系統解析による分離株のクラスタリング解析について指導した。

放線菌・バイオレメディエーション菌サブグループでは、化学分類学的手法である脂肪酸解析、キノン解析、細胞壁アミノ酸組成解析、全菌体糖組成解析、リン脂質解析、DNA-DNA 相同性試験、電子顕微鏡観察、嫌気性細菌の取り扱い方法について指導した。

乳酸菌・アーキア・ファージ・窒素固定細菌サブグループでは、乳酸菌の品質管理方法、プロテアーゼ・アミラーゼ試験方法、リトマスミルク試験方法、高度好塩菌の分離方法・培養法、メタン生成細菌の分離・培養法、ファージの分離法について技術移転した。

藻類サブグループについては、顕微鏡による形態観察及び分子系統解析結果に基づく、微細藻類の同定方法や蛍光プレートリーダーを用いた脂質生産能力の迅速な推定手法について技術移転を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

インドネシア研究メンバーの中で、担当テーマとは異なるインドネシア産微生物の有用性が見いだされたことから、メンバー構成を組み替え、インドネシア産微生物の有用性評価のためのゲノム解析を加えた。したがって、日本側もそれに併せて指導者を確保すべく、研究代表者が所属する機関に新たなメンバーを追加した。

2.3 【研究題目3】農業利用および環境・生態系保全に有用な機能をもつ微生物の分離と応用(東京大学)

①研究のねらい

土壌圏の物質循環に関わる微生物の研究は、インドネシアの農耕地(水田および畑)の土壌圏物質循環に着目し、農耕地から発生する一酸化二窒素(亜酸化窒素)の発生低減、窒素肥料による窒素負荷の低減、リン肥料の節約等への応用が期待される細菌等を分離し、性状を解明する。また、農業生産や農耕地周辺の生態系保全に寄与する機能遺伝子の多様性を解明する。

菌根菌に関する研究については、熱帯樹木に共生する菌根菌の多様性や機能を調べ、熱帯林の再生や荒廃地の環境修復に利用可能な菌根菌を分離・収集する。

②研究実施方法

土壌細菌については、インドネシアの水田土壌から細菌を分離し、その中から脱窒活性を有するものを選別する方法(従来法)によって、脱窒細菌の培養株を獲得した。また、脱窒作用が活発になる培養条件下で細胞分裂を行っている細菌を、マニピュレーターを用いて顕微鏡下で半選択的に分離する手法(Functional Single Cell (FSC) 分離法)によっても、脱窒細菌の培養株を得た。ダイズおよびラッカセイの根粒から、根粒細菌を分離した。水田や畑を含む各種土壌から、窒素源を含まない培地を用いて自由生活型の窒素固定細菌を、また、リン酸塩を含む培地を用いてリン酸塩溶解細菌を、それぞれ分離した。これらのうち選別された株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて系統解析を行い、簡易的な同定を行った。分離株のうち系統的な新規性が高いと思われる分離株については、分類学的性状試験を行って新種記載を行う予定である。選別された株について、硝酸から一酸化二窒素または窒素分子への変換量をガスクロマトグラフィにより測定した。分離・培養が非常に困難なメタン酸化細菌を資源として得るため、水田土壌を接種源として集積培養を確立した。さらに、インドネシアの水田土壌から抽出された DNA を鋳型として PCR 産物のクローンライブラリー解析を行い、土壌中に存在する脱窒に関わる機能遺伝子の多様性解析を行った。

菌根菌については、熱帯雨林から樹木に共生する菌根菌を網羅的に収集・同定し、系統解析や多様性解析を行った。樹木への接種試験によって、有用な菌根菌株を選抜するとともに、成長促進効果機構を明らかにした。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(1) 脱窒細菌

インドネシア各地で採取された水田土壌から細菌を分離し、分離株の中から脱窒活性をもつ細菌をスクリーニングした(従来法)。これまでに 200 以上の一次分離株の中から脱窒細菌として 21 株を純粋培養株として獲得し、属レベルの同定を行った。これらの中には、これまで脱窒細菌として知られていなかった分類群の細菌も含まれる。また、温室効果ガスである一酸化二窒素(N_2O)から温室効果のない窒素分子(N_2)への変換率が 30%を超える株は 11 株含まれており、これらは将来の応用研究への利用が期待される。

上記のような伝統的な脱窒細菌スクリーニング法では脱窒細菌の取得率が低いと判断し、Functional Single Cell(FSC)分離法を用いて脱窒細菌の半選択的分離を行い、一次分離株 170 株を分離した。これを母集団として脱窒細菌をスクリーニングしたところ、169 株が脱窒細菌を含むことが確認され、うち 146 株は

脱窒率 80%以上を示した。今後、これらの株を純化し、脱窒細菌の純粋培養株を得てから分類群の同定と $N_2O \rightarrow N_2$ 変換率の測定を行う。

(2) 窒素固定細菌(根粒細菌を含む)

インドネシアの各地・各種の土壌から 180 ほどの窒素固定細菌候補となる株を分離した。これら一次分離を純化し、151 株の窒素固定細菌の培養株を得た。これらの中には、少数だが新種候補が含まれる。今後、詳細な分類群同定や窒素固定活性(または根粒形成能、植物への接種効果など)の試験により、株の重複を排し、またより活性の高い株を選別する予定である。また、新種候補については分類性状を試験して新種記載を目指す。

(3) リン酸塩溶解細菌

インドネシアの各地・各種の土壌から 50 株のリン酸塩溶解細菌を分離した。今後、詳細な分類群同定を行い、非常に近縁な株が多数分離されている場合は、それらの中から少数を選抜して株数を絞り込む予定である。

(4) メタン酸化細菌

インドネシアの水田から採取された土壌試料を接種源として、集積培養を行っている。機能遺伝子の検出により、集積培養中の目的細菌の存在を確認し、集積培養はほぼ確立できたと考えられる。メタン酸化細菌の集積培養のメタン酸化速度を測定し、おおむね良好な結果が得られている。

(5) 水田土壌中の脱窒に関わる機能遺伝子の多様性解析

インドネシアの各地の水田から採取された土壌試料から DNA を抽出し、その中に含まれる細菌由来の亜硝酸還元酵素 NirS および NirK について、その遺伝子 *nirS* および *nirK* をクローニングし、それぞれ約 500 クローンの塩基配列を解読してアミノ酸配列を推定した。その推定アミノ酸配列に基づき、それらの系統を明らかにした結果、既知のアミノ酸配列と系統的に離れているアミノ酸配列が認められ、インドネシア(あるいは東南アジア)の水田に特徴的な系統である可能性が考えられた。一方、ジャワ島西部とバリ島の水田との間に明確な差は認められなかったが、同じジャワ島西部の水田であっても土壌塩類濃度の高い海浜地域の水田に由来するアミノ酸配列が特異的なクラスターを形成していたことから、土壌の塩類濃度に応じて異なる系統の亜硝酸還元酵素が機能している可能性が考えられる。

(6) 菌根菌

スマトラ島およびカリマンタン島の熱帯雨林でスマトラマツの林にて現地調査を行い、菌根菌の種組成や多様性に関する解析を進めている。また、スマトラ島、およびジャワ島で採取した菌根菌から多数の菌根菌株を単離し、現在、種同定と接種実験を実施中である。ほぼ当初の計画どおり目標が達成されており、順調な進行状況である。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

土壌細菌の研究では、これまでに分離された脱窒細菌(一次分離株の状態では純化されていないものは除く)および窒素固定細菌をカルチャーコレクションに寄託した。また、インドネシア訪問時にはカウンターパートでありインドネシア側と繰り返しディスカッションを行い、特にインドネシア側がリーダーシップをもって進めているリン酸塩溶解細菌の分離とメタン酸化細菌の集積について助言を与えている。さらに、東京大学にてインドネシア研究者を招聘し、共同で実験作業を行うとともに、細菌の簡易的同定手法を指導した。

菌根菌の研究では、スマトラ島およびカリマンタン島の菌根菌調査、ジャワ島での菌根菌採取、FORDA 苗畑での接種実験など、現地の研究活動は全てカウンターパートと一緒にを行い、専門的技術の移転を行

った。また、インドネシア側研究者をのべ約120日受入れて、菌根菌の分子同定技術の研修を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況特になし。

2. 4 【研究題目4】 家畜プロバイオティクスの分離・機能開発と応用 ((独)理化学研究所)

①研究のねらい

インドネシアの畜産業の主要な家畜であるニワトリとウシに着目し、腸管内の微生物を分離しその生態系を明らかにすると同時に、プロバイオティクス機能を有すると思われる微生物株を取得する。得られた微生物株について、プロバイオティクスとしての有効性を評価し、養鶏産業及び家畜産業への適用を目指す。

②研究実施方法

インドネシアにおいてニワトリおよびウシルーメンから微生物の分離を中心に実験を行う。分離された微生物株については同定を進める。インドネシア側研究者が日本に滞在中は分離された微生物株について分類学的研究を行う。平成 25 年度はニワトリから分離した新種の嫌気性細菌のうち、3 種について詳細な分類学的研究を行い、新種として提唱するためのデータを収集するとともにプロバイオティクス機能を有する乳酸菌のスクリーニングを行った。ウシルーメンでは引き続き微生物の分離を行い、ニワトリと同様に分類学的研究とスクリーニングを行った。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

2012 年 2 月に日本人研究者がインドネシアにてニワトリからは約 200 菌株、またルーメンおよびサイレージからも約 50 菌株の嫌気性細菌および乳酸菌を分離した。同年 5 月には再度インドネシアに渡航し、ルーメンからの嫌気性菌の分離について嫌気チャンバーを用いて試みた。およそ 180 株を分離、凍結保存し、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。シーケンス解析の結果、分離した好気性菌の中にも新種の菌株が存在することが明らかとなった。

2013 年 2 月に日本人研究者がインドネシアにて再度ニワトリ盲腸便からの嫌気性菌の分離を行った。4 つの異なる培地を用いて 2 サンプル(ブロイラー9 日齢 および地鶏 6 ヶ月齢)から 900 株以上を分離し保存した。ニワトリ盲腸便から分離した菌株のうち、58 株について 16S rRNA 遺伝子配列の解析結果を得た。58 株は全て 9 日齢ブロイラーから分離した菌株である。58 株のうち 34 株が新種である可能性が示された。

2013 年に継続して行った 16S rRNA 遺伝子解析結果から、500 株以上が新規分類群候補であることが明らかになった。同年 6 月にインドネシア人研究者が来日し、理研 BRC 微生物材料開発室にて、9 株については分類学的研究を行った。現在、一報を International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) に投稿中である。残りについては投稿準備中である。プロバイオティクス機能を有する菌株の選抜は、供試菌株として 100 株以上の乳酸菌を用いて、選抜を行った。選抜実験として抗菌試験をはじめ 3 種の実験より 15 株にまで候補株を絞り込んだ。

ウシルーメンからこれまでに約 800 株の細菌を分離した。分離菌株のうち、180 株に対して 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果、新種の好気性細菌を分離したことが明らかになった。ウシルーメンに分離菌株のような好気性菌が存在することは新たな知見である。

2013 年 5 月に日本人研究者が渡航し、ウシルーメンからの分離を再度行った。そのうち 3 株が 16S rRNA 遺伝子解析の結果、新種の候補株であることが明らかになった。その候補株のうち、1 株についてはインド

ネシア人側研究者が来日し、分類学的研究を実施した。現在は投稿準備中である。プロバイオティクス機能を有する菌株の選抜は、1次スクリーニングに18株を供して実験を行ったが現時点で有力な候補株を選抜できていない。

これまでの進捗状況を当初の計画と比較すると、分離や分類学的研究についてはニワトリ、ウシルーメンともに概ね順調であり、これらの成果が平成26年度には論文として成果発表できるものと考えている。一方、プロバイオティクス機能を有する菌株の選抜は、多少遅れていると判断している。しかしながら、ニワトリに関しては概ねスクリーニングが終了しており、次年度には実地試験および分子生態学的解析を平行して実施する予定であり、問題なく終了できると考えている。ウシルーメンについてはスクリーニングに供した菌株数が少ないため、次年度は数を増やしてスクリーニングを実施して行くことにより、遅れを解消できるものと考えている。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

2012, 2013年に嫌気性菌および乳酸菌の分離、培養、凍結保存、16S rRNA 遺伝子増幅について技術移転を行った。

2014年に嫌気性細菌の表現性状試験、生理生化学試験、化学分類学的試験等の同定に必要な試験方法、実験機器の使用法の技術移転を行った。また、分子生態学的解析法としてクローンライブラリー法などの技術移転を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)特になし。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0件、国際 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、国際 0件)

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0件、国際 0件、特許出願した発明数 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、国際 0件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 「LIPi微生物資源センター設立・運営のための資源管理」 NITEグループ1 【研究題目1】

①研究者グループリーダー名: 鈴木健一郎 ((独)製品評価技術基盤機構・上席参事官)

②研究項目

- ・インドネシア微生物資源センター(InaCC)の運営体制の構築
- ・ISO9001(品質管理の規格)の認証制度及び、OECDの生物資源センター(BRC)のベストプラクティスガイドラインなどを考慮した、インドネシアの国内法令に準拠したInaCC運営マニュアルの策定

- ・活動に必要な設備・器具を整備
- ・InaCC 運営マニュアルに基づく InaCC 技術職員への訓練
- ・InaCC 管理体制への職員の順応
- ・InaCC が保有する微生物株のデータベースの開発とプロジェクト成果情報の充実
- ・公開のための InaCC ホームページの作成
- ・研究題目2～4で得られた微生物株の InaCC への寄託受付
- ・研究題目2～4で得られた微生物株を InaCC から第三者へ分譲するための保存
- ・本プロジェクト以外からの寄託されてきた微生物株の寄託受付と品質管理手続きの確認
- ・プロジェクト終了後の InaCC 運営計画の策定

(2)「新規有用微生物の探索と生態学的研究」NITEグループ2【研究題目2】

①研究者グループリーダー名：川崎浩子（(独)製品評価技術基盤機構・室長）

②研究項目

- ・糸状菌、酵母、放線菌、細菌、アーキア、バクテリオファージ、微細藻類に属する微生物を分離、同定
- ・研究に使用された微生物を、長期保存手法を用いて保存
- ・化学分類学的解析、分子系統分類、微生物保存法の検討、その他国際的な標準手法に基づく解析
- ・人間の生活の向上や、食品生産、農業、環境修復に有用な微生物を評価するための微生物分析
- ・微生物研究者との共同作業により、微生物分類の能力向上研修
- ・研究成果の公表(学術論文への投稿)
- ・選抜した微生物株を InaCC への寄託

(3)「農業利用および環境・生態系保全に有用な微生物の分離と応用」東大グループ【研究題目3】

①研究者グループリーダー名：大塚重人（東京大学・准教授）

②研究項目

3-A: 土壌細菌

- ・農耕地生態系における窒素、炭素及びリンの循環に関与する細菌の分離と、分離株の系統解析を含む分類・同定
- ・メタン酸化細菌の集積培養の構築
- ・分離細菌から農耕地生態系の窒素、炭素及びリンの循環や環境の保全に有用な菌株の選定と性状の解明
- ・農耕地生態系における窒素、炭素及びリンの循環、メタン酸化の環境の保全に寄与する機能遺伝子の解析
- ・研究成果の公表(学術論文への投稿)
- ・選抜した微生物株を InaCC への寄託

3-B: 菌根菌

- ・熱帯雨林からの菌根菌の収集とそれらの系統解析ならびに多様性解析
- ・樹木の成長に有用な菌根菌分離株の選抜
- ・菌根菌の樹木に対する成長促進効果の解析

- ・研究成果の公表(学術論文への投稿)
- ・選抜した微生物株を InaCC への寄託

(4)「家畜プロバイオティクスの分離・機能開発と応用」 理研グループ【研究題目4】

①研究者グループリーダー名: 大熊盛也 ((独)理化学研究所・室長)

②研究項目

4-A:家禽(ニワトリ)

- ・家禽(ニワトリ)の腸内細菌の分離と同定
- ・家禽(ニワトリ)の腸内細菌から分離した菌株について、プロバイオティクスとして有用な株のスクリーニング
- ・選定したプロバイオティクスの家禽(ニワトリ)生産性に対する効果について検証
- ・家禽(ニワトリ)の腸内細菌の分子生態学的解析
- ・研究成果の公表(学術論文への投稿)
- ・選抜した微生物株を InaCC への寄託

4-B: 家畜(ウシ)

- ・家畜(ウシ)の第一胃内及びサイレージからの乳酸菌の分離と同定
- ・第一胃とサイレージから分離した菌株について、プロバイオティクスとして有用な株のスクリーニング
- ・選定されたプロバイオティクスの効果について in vitro で検証
- ・家畜(ウシ)の第一胃の分子生態学的な解析
- ・研究成果の公表(学術論文への投稿)
- ・選抜した微生物株を InaCC への寄託

以上