

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)

平成 24 年度実施報告書

代表者：鈴木 健一郎

(独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター・参事官

<平成 22 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

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。

平成 24 年度は、平成 23 年度に続き、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っている。中核的微生物資源センターに必要な機材の発注、微生物データベースの開発を推進した。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)の次官を招聘し、日本の微生物資源センターの施設見学と意見交換を行い、インドネシアLIPIに微生物資源センター施設の建設を実現した。

2. 研究グループ別の実施内容

【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、LIPI のプロジェクトマネージャーが来日し、NBRC での業務のフローに関する研修を受け、それに基づき、LIPI における作業モデルを構築するとともに、各段階において必要な文書の素案を作成した。具体的には、新規微生物株の受入れのための微生物株寄託申込書(アクセスフォーム)と微生物株を受け入れる際の手順、保存標本作製と作製した標品の管理のためのフローと文書様式、分譲依頼書の様式と、その受付から微生物株の発送までの手順である。合わせて、ISO9001 に基づく手順書の概要を研修した。

(2) データベース構築については、まず LIPI IT チーム代表者に対して 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、問題とな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アドバイスを実施した。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は、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。また、ISO9001 に基づく品質管理システムとその運営と手順書の作成について研修を行った。

(2) データベース構築については、NBRC でデータベースの構成と操作法について研修を行った。また、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行い、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(あれば)

LIPIによる微生物保存施設の建築計画が、インドネシア政府、LIPI 幹部の来日で具体化した。2013 年 7 月完成を目指し、建設中である。これは、機器類の設置や、他の課題にとっても研究の実施場所として大きな環境改善になり、プロジェクトの成果を大きく左右する。建物完成まで積極的に関与して、よい施設の完成を目指したい。

【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

インドネシア固有の新規微生物が多数発見され、インドネシアの微生物多様性が明らかになる。得られた微生物は、インドネシア産リファレンス株としてインドネシアの中核的保存機関となるべき LIPI 微生物資源センターに保存することによって、研究材料として国内外の研究者が利用できる環境が整備される。分類学的研究を通して、各種微生物の専門家を養成し、プロジェクトが終了した

後も微生物資源センターの中心的存在となる。インドネシアの微生物の多様性が認知される。

②研究実施方法

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、インドネシアの様々な環境より分離し、分類・同定を行う。分離した微生物並びに研究に使用した微生物を、長期保存手法を用いて保存する。化学分類、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を行う。加えて、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の活性や機能の分析を行う。インドネシア側の微生物研究者に対し、微生物分類学の知識と技術の能力向上研修を行う。

③当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

対象とする微生物の種類や取り扱い方法によって5つのグループ（糸状菌グループ、酵母グループ、放線菌グループ、細菌・アーキア・バクテリオファージグループ、微細藻類グループ）を結成し、それぞれにインドネシア側と日本側にサブリーダーを設け、年間計画に従い、現地調査、微生物の分離、技術移転を行った。

糸状菌グループでは、キナ（*Cinchona*）に生息する菌類の種多様性に関する研究を実施した。6月、バンドン市にある Research Institute for Tea and Cinchona において植物を採集し、LIPI-RCBにて内性菌類及び葉の表面からスス病菌を分離した。それ以外に、イネ科植物から黒穂様病徴を示す *Drechslera* を分離した。内生菌の分離を行う過程において、内生菌の分離方法について指導した。菌類の分離と同定には顕微鏡が欠かせないが、そのための顕微鏡の調整方法、カメラ撮影方法、メンテナンスについて指導を行った。2回目の渡航（8月）では、6月に分離した菌類の保存状態を確認し、長期保存のための斜面培養、パラフィン重層、 -80°C 凍結保存の指導と実施を行った。現在、合計 946 株を分離することができた。

酵母グループでは、脂質生産酵母の分離と自然界酵母の多様性研究を実施した。カリマンタン島、Cissang、Darmaga にて、土壌、葉、花及び昆虫（シロアリ）の巣を採集し、LIPI-RCB にて酵母菌を分離した。合計で 427 株の酵母を分離した。昨年度の分離も合わせ計 813 株を分離しており、その内 740 株についてリボソーム RNA 遺伝子 D1/D2 領域による簡易同定を行った。油脂酵母のグループでは、10 株の新種候補株を、それ以外にも 76 株の新種候補株を分離することができた。加えて、脂質分析用として LIPI に導入したマイクロプレートリーダー解析について技術移転を行った。

放線菌グループでは、マンナーゼ生産菌と抗生物質生産のための放線菌の分離、そして石油分解菌の検出を試みた。前者では、Savana 他 4 カ所ですと壤とリターの採集を行い、62 株の放線菌を分離した。その内、29 株について分子系統解析ならびに形態観察により同定を行った結果、そのほとんどが *Streptomyces* 属放線菌であった。石油分解菌の検出については、以前の NITE・NBRC と LIPI の共同事業で得られ、NITE に保存されていた好気性の石油分解菌候補株について、再度石油分解能について精査するため、復元を試みた。2 株について純粋培養することができ、それらを同定した結果、新規細菌であることが明らかとなった。

細菌・アーキア・バクテリオファージグループでは、インドネシア発酵食品由来の乳酸菌の多様性研究、高度好塩菌及び好熱性細菌の分離研究、乳酸菌ファージの検出を試みた。乳酸菌の多様性研究では、インドネシアの発酵食品より乳酸菌の分離を試み純化が修了した 158 株を保存した。現在、分子系統解析を進めているところである。さらに、タンパク分解、デンプン分解、 α -ガラクトシダーゼ活性、 β -グルコシダーゼ活性、バクテリオシン生産を目的に、ガジャマダ大学で分離

し保有していた食品由来の乳酸菌 43 株について、純化し再同定を行った。その結果、その多くが *Lactobacillus plantarum* と *Pediococcus acidilactici* のグループであることが判明した。新規分類群は見つからなかったが、有用機能を有する乳酸菌であることが予想されるので、研究終了後には本プロジェクトで構築するインドネシアの微生物資源センターに登録するために、これら乳酸菌を LIPI に移転し保存した。アーキアについては、インドネシア側に専門家がいなかったため、アーキアの分離・培養・保存の技術の移転を目標に、インドネシアの環境サンプルより好熱菌、好熱好酸性菌、高度好塩菌の分離を共同で行った。それぞれ 4 株、3 株、4 株を分離し同定した結果、既知の種であることが推定されたが、インドネシア産のアーキアが株化され分譲を念頭に保存されたのは初めてのケースである。乳酸菌ファージについては、インドネシアの研究者にファージの分離と保存の技術移転を行った。

藻類グループでは、CO₂ 削減のための藻類、エネルギー資源のための藻類、色素生産のための藻類の収集を目的に研究を行った。昨年度ロンボク島より分離した 58 株の藻類について純粋培養を試み、現在 18 株が純粋培養に成功しており、それらについて増殖能測定と形態観察を行った。今年度新たにカリマンタン島の様々な環境より藻類の分離を試みた。インドネシアより 2 名の研究者を招へいし、藻類の培地作成、脂質分析、炭化水素分析、顕微鏡観察について技術移転を行った。

今年度はサンプリングの回数も多く、目的とする微生物の分離も順調に進めることができた。累計 2060 株を分離しており、来年度からは分離した株の機能並びに詳細な同定解析を行い、有用性や新規性を明らかにしていく予定である。

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）

様々な微生物の採集・分離・純化・同定・保存という一連の実験を通して、インドネシア研究員にそれら技術移転を行うことができた。特に、インドネシア側でなじみの薄かったアーキアについても分離と保存技術を伝えることできた。

インドネシアで初めての MALDI/TOF MS を導入し、日本並びにインドネシア側で研修を行い、細菌の迅速同定ができるよう技術移転することができた。MALDI/TOF MS を用いた微生物の迅速同定技術はほぼ定着させることができたので、次は様々な微生物への適用を試みている。微生物資源センターが発足し、微生物の品質管理を行うようになった際には、MALDI/TOF MS をその品質管理に利用したいと考えている。

インドネシアの若手研究者を対象に、乳酸菌の分子系統解析のワークショップを開催した。

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）マラリア特効薬として知られるキナ植物から多くの菌類が分離できたことで、これら菌類の二次代謝産物の解析を行い、何らかの有用性について評価することとなった。

【研究題目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（東京大学）

①研究のねらい

A. 農耕地の土壌圏の物質循環に着目し、インドネシアにおける農業生産や農耕地周辺の生態系保全に貢献する細菌や関連する機能遺伝子の多様性を解明しつつ、環境負荷が小さい微生物肥料の開発、農耕地から発生する亜酸化窒素ガスの低減、農耕地周辺環境の硝酸汚染の低減等に利用可能な細菌資源を分離し、性状を解明する。

B. 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

A. 主にインドネシア農耕地(水田および畑)の土壌から、脱窒細菌および根粒細菌を分離・培養し、系統解析による簡易同定を行い、系統的な新規性が高いと思われる分離株については、新種記載を行う。また、分離株の脱窒能や窒素固定能の測定を行う。さらに、分離・培養が非常に困難なアンモニア細菌やメタン酸化細菌を資源として得るため、集積培養を確立する。これらと平行して、インドネシア農耕地土壌における、脱窒、窒素固定、アンモニア酸化、メタン酸化に関わる機能遺伝子の存在量や多型性を解析する。

B. 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う。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する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

A. カウンターパートとともに野外調査を行い、脱窒細菌および窒素固定細菌の分離と同定、脱窒能の高い細菌株の選定、脱窒機能遺伝子の解析等をカウンターパートと共同で進めている。また、LIPI においてメタン酸化細菌の集積培養を開始した。これらはすべて計画されていた実験項目である。当初の目算よりは分離株数が少ないが、おおむね順調である。

B. 当初の計画通り、スマトラ島の2ヶ所においてカウンターパートと現地調査を実施し、菌根菌の種組成や多様性について解析を終了した。また、調査地から採取した土壌中の菌根菌の分離と同定を行い、新たな菌根菌の菌株を得ることができた。

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)

A. カンターパートが来日した際、共同で文献調査を行い、インドネシア国内では参照困難な原著論文から多くの情報をカウンターパートに供与した。また、共同で名古屋大学の浅川晋博士を訪問し、メタン酸化細菌の集積や分離に関する技術情報を入手した。また、インドネシア訪問時に、カウンターパートの下で研究を進めている研究者や技官、学生らと、実験データを見ながら頻繁に打ち合わせを行い、メタン酸化細菌の集積培養の維持および細菌組成解析に関する助言を行った。

B. FORDA の苗畑において菌根菌の埋土胞子を調べる実験を共同で実施し、関連技術の移転を行った。同時に、菌根からの菌株分離方法について実技指導を行った。若手インドネシア人研究者1名を研究室に2ヶ月間受入れ、菌種同定に不可欠な DNA 抽出、PCR、RFLP、シーケンスなどの分子生物学的研究手法を指導した。

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。

【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(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。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

2012年5月に日本人研究者がインドネシアに行き、ウシルーメンおよびサイレージから嫌気性細菌および乳酸菌を分離した。培地はGAMおよびMRSを用い、培養は嫌気チャンバーを使用した。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、分離した菌株は目的とした嫌気性菌ではなく好気性菌であることが判明した。嫌気チャンバーが期待した嫌気状態に達していなかったと推定されたが、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行き、ニワトリ盲腸便(ブロイラー9日齢、地鶏6ヶ月齢の2羽)から4種類の培地を用いて約900菌株の嫌気性細菌を分離した。分離した菌株については凍結保存を行い16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析の結果、新種と推定される菌株が多数分離されたことが明らかとなった。

今年度、分離株について分類学的研究を進めるためにインドネシア研究者2名が日本に滞在する予定であったが、目的の菌株が分離できなかったために来年度分類学的研究を実施することとなった。

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)

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。

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、海外 0 件)

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0件、海外 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、海外 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

- ・微生物資源センターの活動に必要な設備・器具を整備
- ・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、インドネシアの国内法令に準拠した微生物資源セ

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

- ・最新の微生物学の動向に従って、微生物資源の保存技術と品質管理法を発展
- ・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（微生物株の保存及び分譲体制の構築）
- ・微生物株のデータベースの開発と充実

(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

(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
- ・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や環境の保全に寄与する機能遺伝子を解析

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

(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

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

以上