

微生物インベントリー：植物生息微生物・病原微生物

農業環境インベントリーセンター
微生物分類研究室
對馬誠也

1. はじめに

微生物は、地球の物質循環に深く関わり、生態系のバランスを維持する上で大きな役割を果たしてきたと言われている。また一方では、微生物は、地球上で生じた過酷な環境変化に適応してきた結果、生息場所特有の様々な機能を有していると考えられている。したがって、これら微生物の環境中での役割や機能を解明することは、環境保全のみならず、農業、医療、工業分野でも役立つと思われる。

しかし、これまで研究されてきた微生物は、物質分解や窒素循環などに関わる微生物、植物の寄生・共生菌、あるいは抗生物質生産菌など主として農業生産、医療などに深く関わる微生物が多く、微生物全体からみると限られたものにすぎず、その他多くの微生物の役割などは未解明である。また、せっかく収集した微生物やその情報も、研究者の目的にあった情報や微生物株に関しては公表されるものの、興味のない情報に関しては、公表されないまま破棄されることが多い。

一方、近年、生物多様性条約など環境問題への関心の高まりや、微生物の解析技術や情報処理技術（バイオインフォマティクス）の進展により、環境中の微生物情報を人類、あるいは国の財産として集積していくことを目的として、国の内外で様々な取り組みが始まっている。

農業環境技術研究所では、農業環境資源の様々な情報を集積し、農業環境の変動予測、保全・管理に役立てるため「農業環境インベントリー（在庫目録）の構築」を研究の柱の一つに掲げ研究を進めているが、ここでは、その中で微生物分類研究室が取り組んでいる「微生物インベントリー」（*microForce* と称す：商標登録申請中）を紹介するとともに、研究テーマとして取り組んでいる植物生息微生物の分類・同定や機能などに関して紹介したい。

2. 微生物の収集や情報蓄積に関する国内外の取り組み

1992年の地球サミットで生物多様性条約が採択されて以来、国内外で生物多様性に関する様々な取り組みがなされている。たとえば2001年、種や標本レベルのデータ整備、分散型データベースの構築を行うとともに、将来的には遺伝子、生態レベルなどの情報収集も行うことを目的として、国際的科学協力プロジェクト「地球規模生物多様性情報機構」（GBIF）が設立された。同じく2001年にOECDは「生物資源センター」（BRC）報告書において、BRCの必要性を示して各国にその強化を呼びかけた。わが国では2002年4月に「かづさ」に国内最大規模の生物遺伝資源センター（NBRC）が開設され、微生物の収集・保存・分譲や、それらの遺伝子情報の提供に取り組んでいる。

このように、微生物情報の収集・活用への要望は著しく高まっているが、こうした取り

組みはまだ緒についたばかりであり、有用菌の保存事業はともかく、無限ともいえる膨大な微生物情報（分離源、生息場所、各種機能、DNA 配列など々）の収集・蓄積に関しては、各専門機関がそれぞれの目的に応じて情報収集・管理体制を充実させなければならない段階にある。

3. 微生物とは

微生物は小さな生物の総称であり、その中には、原核生物（細菌、藍色細菌、古細菌）と真核生物の一部（糸状菌、酵母、原生動物など）があり、時には、ウイルスなども含まれる。これらの微生物が環境中にどのくらい生息しているのかに関しては、いくつかの報告がある。たとえば、植物の葉面に生息する細菌は、1cm²当たり平均 10⁶~10⁷個といわれ、地球全体でみると約 10²⁶個と推定されている。また、土壌中には、土壌 1g 当たり約 10¹⁰個の細菌が生息しているとの報告もある。このように、環境中には膨大な数の微生物が生息し、生態系における同化的代謝、異化的代謝の主要部分を担い、あるものは病原性微生物として他種生物の増殖に関係し、また生理活性物質生産能を持つものは産業に広く利用されている。しかし、既知の微生物種は、上記に示した微生物のうち 1~7%といわれており、微生物情報の収集・蓄積は他の生物に比べ著しく遅れている。

4. 微生物インベントリー (*microForce*) の概要

微生物情報は利用されなければ意味がない。そのため、1) 情報の収集、2) 情報の加工、3) 情報発信の3段階で工夫が必要と思われた。そこで、我々は、3) の情報発信に関しては、「微生物インベントリー」を Web などで知った人が親しみを持てるように、このイベントリーを「*microForce*」（現在商標登録申請中）と名付け全ての微生物情報をこの *microForce* から発信することにした。次に、微生物情報は様々なデータベースで構成されているため、各データベースに合った提供法を考えた。具体的には、公開可能な情報に関しては、Web で公開 (*microForce*-Web) し、Web では利用できない機能解析（系統解析、主成分分析、プライマーの設計、国際的 DNA バンクからの DNA 情報の取得など）は、データベースと機能解析ソフト付きの CD-ROM (*microForce*-CD) を作製して情報提供することを考えた。また、現在研究中の植物生息微生物情報は非公開情報として、共同研究の中で活用を行うことにしている。さらに、ユニークなシステムとしては、環境微生物などの同定依頼に関して迅速に同定できる「細菌迅速同定支援システム」(*microForce*-ID) を作成して、依頼などに迅速に対応できるシステムを作成した。以下に、現在公開中の 1) *microForce*-Web (<http://www.niaes.affrc.go.jp/inventry/microorg/index.html>)、2) 植物生息微生物情報（非公開情報）および 3) *microForce*-ID に関して簡単に紹介する。

1) *microForce*-Web

本システムは「総合検索」、「データベース一覧」、「総合検索の使い方」、「他の微生物情報紹介」からなっている。「総合検索」が本システムの本体でデータベースからキーワードによる検索を行うことができる。しかし、データベースによっては、目的とする情報をどのようなキーワードで検索できるのかが難しい場合がある。そのため、「総合検索の使い方」では、総合検索の利用法を簡単に解説するとともに、データベース毎にディクショナリーを

つけて項目 (Item) 毎に入力されているデータ内容を表示することにした。これにより、ユーザーは検索対象とするデータベースの項目毎のデータ内容をあらかじめ印刷しておく、それを見ながら簡単にキーワード検索ができるようになっている。「データベース一覧」では、個々のデータベースの簡単な紹介を行った。さらに、「他の微生物情報」では微生物保存機関や国際的な微生物情報ネットワークを中心として関連サイトを紹介した。

(1) 微生物データベース単独での利用

各種微生物データベース毎にホームページを作成して単独に Web 上で公開した。この利点は、単独の微生物データベースの場合、目的に応じて他の機関へのリンク掲載依頼などによる普及が可能ながあげられる。そのため、宣伝の仕方によってはより多くのユーザーに活用してもらえると考えた。

本インベントリーでは、現在「日本野生植物寄生・共生菌類目録」(<http://www.niaes.affrc.go.jp/inventory/microorg/mokuroku/mokuroku.htm>) と「日本産糸状菌類図鑑」(<http://www.niaes.affrc.go.jp/inventory/microorg/mokuroku/zukan.html>) を公開しており、それぞれのデータベースは、世界規模生物多様性情報機構 GBIF・Japan (Global Biodiversity Information Facility, Japan) の「生物多様性情報サイト」からも閲覧することができるようになっている。以下にデータベースの概略を記す。

(ア) 「日本野生植物寄生・共生菌類目録」(日本語版, 英語版)

1910年代から2002年にかけて日本で報告された95科1626種の野生標本植物に寄生、共生あるいは単に生息しているサビ菌、クロボ菌、エンドファイト(内生菌)など312属1302種の糸状菌および細菌の学名、異名、発生状況などを含む文献などを記載し、日本野生植物寄生・共生菌類目録(月星ら, 2002)として発行した。さらに、それをデータベース化してWeb上で公開した。このページは菌名および植物名の一覧表からの検索や、キーワードによる検索が可能である。目的とする菌類の学名、異名、和名および文献名を表示できる。

(イ) 「日本産糸状菌類目録」(日本語版, 英語版)

上記の目録化した菌類のうち、糸状菌48種について、学名、分類、発生状況、無性世代ならびに有性世代の画像、病徴画像および農環研所蔵標本リストなどを記載した「日本産糸状菌類図鑑」として公開した。この情報は菌類目録の検索結果とリンクしており、検索した菌類の一部について画像などを閲覧できる。

(2) 統合検索システムを用いた微生物情報の活用

微生物の中にはしばしば複数の機能をもつものが報告されている。たとえば、ある種の細菌は人畜や植物に共通の病原菌として研究されている一方で、化学合成物質の分解菌として研究されているものがある。また、そうした細菌はしばしば環境中(土壌、植物など)から分離されているため、それらの分離源情報は、その微生物を探索している研究者には貴重な情報と考えられるが、専門家であっても、自分の関心以外の情報については把握できないことが多い。しかし、近年、環境問題への関心の高まりとともに、微生物の実用化試験や、室内の実験で取り扱う際に、対象微生物の人体への影響(バイオセーフティレベ

ルなど) や、環境中での役割、生息場所などに関する情報がすぐに検索できることは研究推進などや技術開発上必要になってきた。しかし、各研究者が作成する微生物の情報は、機能、ゲノム、分類情報など、それぞれの研究目的に応じて得られた限られた情報にすぎないことから、単独の情報としてのニーズは高くないことから、ここでは、一つのキーワードにより複数のデータベースから同時に関連情報を検索できるシステムが重要と思われた。そこで、本インベントリーでは、分散型統合検索データベース（国立遺伝研宮崎ら作成、一部改変）により必要な情報を一度に検索できるようにした。具体的には、一つのキーワードを入力するだけで、指定した複数のデータベースから関連情報を一度に検索することが可能である。一例を示すと、下記の4つのデータベースを「all」を指定して選び、その後、検索画面で“Genus=Burkholderia”を入力して検索すると、4つのデータベースから *Burkholderia* 属細菌に関連する情報が画面に表示される。これにより、「*Burkholderia cepacia* 近縁菌データベース」以外の3つのデータベースのいずれにもキーワードに該当する情報があることが瞬時にわかるようになっている。

(3) 各種データベース

(ア) 「除草剤 2,4-D 分解菌データベース」

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D) は世界的によく使われてきた代表的な除草剤であり、微生物分解や生物毒性のモデル化合物として早くから取り上げられてきている。微生物分解の研究では、細菌による好氣的分解過程について比較的研究が進んでいる。その分解経路では、まずジオキシゲナーゼ TfdA により側鎖が切断されて 2,4-dichlorophenol となり、これがヒドロキシラーゼ TfdB により 3,5-dichlorocatechol に変換される。3,5-dichlorocatechol は、芳香環開裂から始まるクロロカテコール分解経路 (modified ortho-cleavage pathway) により完全分解される。分解経路は、このように複数の異なる酵素反応から成り、関与する分解遺伝子群も複数の由来からなると考えられている。そのため、各分解酵素・遺伝子群やそれらの発現調節機構について生化学的・分子生物学的な解析が進められるとともに、進化学的な観点から分解菌・分解遺伝子の生態学的解析も行われており、そうした研究へのニーズに役立てるために、ここでは、2,4-D の分解菌に関わる文献情報 (161 件) を公開した。菌株名、種名、分解遺伝子名および初出文献名などが検索でき、分解遺伝子の塩基配列や研究状況も知ることができる。

(イ) 「*Burkholderia cepacia* 近縁菌データベース」

Burkholderia cepacia やその近縁細菌は、広く環境中に生息するが、人畜や植物に病気を起こす有害系統を含む一方で、農薬などの化学合成化合物の分解菌として知られる系統もあり、それらの微生物は環境改善に有効な細菌として多くの研究が行われている。ここでは、*Burkholderia* 属細菌に関する情報 (49 件) を公開した。農学、工学、医学分野の情報を初めて網羅的に整理している。菌株名、種名、採取場所、人畜および植物に対する病原性などが検索できる。

(ウ) 「農業環境技術研究所微生物標本館所蔵標本データベース」

農業環境技術研究所農業環境インベントリーセンターの微生物標本館は、農林水産省傘下の独立行政法人としては数少ない微生物標本保存施設であり、寄託された微生物ホロタ

イプ標本に NIAES No. をつけて保存している。さらに、1880 年代から現在に至るまでの約 120 年間に寄贈・採取された生物乾燥標本、微生物乾燥さく葉標本など約 5,000 点を保存しており、古くは、Lagerheim, G. V. (採取期間; 1887-1901) や Sydow, P. (採取期間; 1896-1902) などの標本が保管されている。このサイトでサビ菌、クロボ菌などの微生物標本画像を中心に、寄主植物や採集場所などに関わる情報 (448 件) を公開した。微生物種名や寄主植物名などで検索できる。

(エ) 「バイオセーフティレベル (日本細菌学会作成)」

この「Biosafety level」データベースは、細菌を取り扱う時の注意を喚起するために、日本細菌学会のバイオセーフティ委員会が作成した「病原細菌に関するバイオセーフティ指針」(日本細菌学会のHPで公開中)にある「付表：病原菌のバイオセーフティレベル分類」を日本細菌学会の許可を得て掲載した。この指針には、JSB (日本細菌学会)、DSM (ドイツ)、NIID (感染症研究所) のバイオセーフティレベル分類が掲載されている。

2) 植物生息微生物の分類・同定と機能

前述したように、植物生息菌には、様々な機能 (農薬・毒素などの物質分解、紫外線耐性など) を有していると考えられる。たとえば、微生物防除資材に適した微生物菌株の条件としては、防除回数の削減のみならずコスト削減の面から、防除効果を少しでも長く持続させることが重要と言われている。しかし、実用段階において防除効果の低下を招く要因として、その植物に生息している微生物との競合などの影響が挙げられていることから、資材となる菌株を選抜する際には、その植物への定着能が優れている菌株がより有効である。しかしながら、一方では、生物防除資材の開発のために、候補となる菌株を選抜するためには、時間と労力がかかり容易ではない。植物生息微生物に関する研究は、こうした微生物資材の効率的探索や利用法に関して、新たな情報や戦略を提供できるものとする。また、遺伝子組換え作物や化学農薬などを新たに導入する際の環境影響評価の指標として、植物に生息している微生物を活用することも考えられる。従来、有用微生物の探索は土壌や特殊な環境下 (極限環境) から採取されてきたが、植物体上にも前述したように特殊な機能を有する微生物が多数生息しているであろうとの考えから、主として細菌の定性、定量的な情報を収集してインベントリに蓄積し、活用することにした。一例として、イネの細菌相の解析結果について紹介する。

農業環境技術研究所 (つくば市) の水田で慣行栽培されているイネ (品種: コシヒカリ) を供試した。イネの採取は、2001 年 6 月 (出穂期 1 ヶ月前) と 7 月 (出穂期) の 2 回行った。外観上健全な株から葉鞘を採取し、表生菌とその他内生菌とを大まかに区別するために、鞘の洗浄液 (対象: 表生菌)、洗浄後の葉鞘磨砕液 (対象: 内生菌と表生菌の一部) から細菌を分離し菌数を調べるとともに、16S リボゾーム DNA の塩基配列に基づいて、細菌のグルーピングを行った。

その結果、イネの生重 1 グラム当たりから分離される細菌数は、 $10^6 \sim 10^8$ 個であり、出穂期 1 ヶ月前と出穂期では出穂期の細菌数が多く、葉鞘磨砕液と洗浄液とでは葉鞘磨砕液からの細菌数が多かった。さらに、最上位葉鞘と穂では、穂から分離される細菌数が多かった。また、細菌をグルーピングした結果、それぞれの分離時期や分離方法の違いにより分離される細菌群には、大きな違いは認められず安定していることや幾つかの優占細菌群

が存在していることが明かとなった。出穂期1ヶ月前では、葉鞘洗浄液と洗浄後の葉鞘磨砕液には、*Microbacterium* 属と *Sphingomonas* 属と推定される細菌が、それぞれ全体の約30%を占め、出穂期では、葉鞘磨砕液と洗浄液ともに *Sphingomonas* 属と推定される細菌が全体の約70%を占めていた。

さらに、これらの微生物から農薬の展着剤などから作られる環境ホルモン物質であるノニルフェノールの分解菌や、各種病原菌に対し強い拮抗能を示す細菌の存在も明らかになった。

同様に、現在まで、イネの他にトマト、コムギ、オオムギ、イチゴ、コマツナなど々の作物から細菌約15,000株を分離しデータベース化するとともに、それら微生物情報を様々に加工して活用できるシステムの構築を目指している。

3) 細菌迅速同定支援システム (*microForce-ID*) と病原細菌などの同定

植物病原細菌を含む細菌の同定には従来から多数の細菌学的性質を調査して、細菌種を決定する方法が用いられている。これらの方法は、過去に報告された細菌種と詳細に比較する際に役立つが、反面、時間と手間を要する。このため、煩雑さを少しでも減らすために、遺伝子情報などをもとに細菌を同定する手法など様々な報告がある。

一方、近年、農業環境から分離された微生物農薬に有望な細菌や窒素固定細菌などの特許取得などを目的とした同定へのニーズが著しく増加しているが、それとは逆に、病害防除に係わる研究現場においては、細菌を扱う場面が糸状菌と比べて圧倒的に少ないため、細菌の取り扱いや試験結果の判定に苦慮することも少なくない。以上のような状況を踏まえ、これらの問題を解決する一案として、罹病サンプルや菌株を受け付けて、細菌の同定を行うシステム「細菌迅速同定システム (仮称)」の構築に取り組んでいる。そのために、まず細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」を作製した(篠原ら, 2005b)。

「*microForce-ID*」の同定計算に必要な細菌学的性質 (API20NE) のデータベースは、「簡易同定96」(基礎データは2004年版)に新たな細菌株の情報を追加したもので、微生物分類研究室が収集保存してきた株および農林水産微生物遺伝資源 (MAFF) 登録株のうち、植物病原細菌を中心とした約30属380種類の2500余株の情報を集積している。菌株データベースは、学名、菌株名、分離年月日、同定者、分離源 (植物名、品種、分離部位など)、分離場所 (地名、地目など) を基礎データとした。これら菌株毎の諸データをデータベースソフトウェア Access2003 (Microsoft) で作成したデータベースに入力した。同定に用いる計算方法は西山の方法 (1997) を採用した。「*microForce-ID*」は、遺伝子の塩基配列情報などは未だ収録されていないが、ある程度対応できる域に達している。また、微生物分類研究室が推進している植物に生息する微生物の同定にも役立っている。

5. 今後の課題：微生物インベントリーの活用

一般に、研究者は、データ数が少ない場合データベースとしての価値を過少評価し公開をためらうことがしばしばある。しかし、「微生物インベントリー」では、統合検索システムで他のデータベースと連携してユーザーに情報を提供できるため、小さなデータベースでも十分に役立つ。そのため、今後も個々の研究者が作成した小さなデータベースも含めて新たに追加していく予定である。

また、ある程度農業環境中の微生物情報が集積されると、近年分子生物学などで IT を駆使した研究が進められているように、その膨大な情報をもとに、最新のバイオインフォマティクスを用いた解析を行うことも可能となってくる。このため、微生物情報の収集・蓄積と並行して解析用の各種ソフトなどの開発・利用も行う予定である。