

多摩川流域に生息する水生植物から分離した糸状菌を用いた
抗冷水病活性物質の探索

2022年

酒井 一成

共同研究者

大橋 知丈

加藤 翔

常盤 俊之

肥後 茉由佳

野中 健一

浅見 行弘

目次

序論	2
本論	
1章 水生植物からの真菌類の分離・同定・培養液作成	7
1-1. 水生植物のサンプリング	7
1-1-1. サンプリング地点・方法	
1-1-2. 水生植物の遺伝子解析による同定	
1-1-3. サンプリング結果	
1-2. 真菌類の分離と遺伝子解析による同定	12
1-2-1. 希釈平板法による真菌類の分離	
1-2-2. 遺伝子解析および近縁属・種の推定	
1-2-3. 真菌類分離結果	
1-3. 水生植物由来真菌類培養液の作製	23
1-3-1. 種培養	
1-3-2. 生産培養	
1-3-3. スクリーニング用微生物培養抽出液の調製	
2章 冷水病菌に対する活性評価系の構築	24
2-1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の評価に用いる	
評価方法の検討	24
2-2. 抗 <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 評価法の条件検討	24
2-2-1. <i>F. psychrophilum</i> 培養条件の検討	
2-2-2. 生物活性評価方法の検討	
2-2-3. 増殖曲線作成	
2-2-4. 溶解溶媒の検討	
2-2-5. 添加サンプル量の検討	
2-2-6. ポジティブコントロールの検討	
2-3. 条件検討結果	29
3章 抗冷水病菌活性スクリーニング	30
3-1. <i>F. psychrophilum</i> に対する活性物質の探索	30
3-2. FKI-10298～FKI-10368 株のスクリーニング結果	30

4 章 抗 <i>F. psychrophilum</i> 活性物質の単離精製	32
4-1. <i>Trichoderma lixii</i> 培養物からの <i>F. psychrophilum</i> に対する活性物質精製	32
4-1-1. <i>T. lixii</i> FKI-10310 株 F36 培地培養物の <i>F. psychrophilum</i> に対する活性評価	
4-1-2. <i>T. lixii</i> FKI-10310 株の F36 培地培養物の作製およびエタノール抽出	
4-1-3. <i>T. lixii</i> FKI-10310 株 F36 培地培養物の抗 <i>F. psychrophilum</i> に対する 活性物質精製の条件検討	
総括	34
参考文献	36
実験材料・機材・培地組成	39

序論

日本の森林率は68.5%であり、国土の3分の2を占める。豊かな森林による水源涵養機能などにより日本は水に恵まれており、地域ごとに河川や湖沼において特色のある漁業が営まれてきた。内水面漁業とは一般的に河川や湖沼などの内水面で行われる漁業及び養殖業を指す。河川で捕獲されるアユやワカサギ、湖沼や養殖池で養殖されるウナギやコイなど、和食文化と密接に関わる様々な水産物を供給している。河川は多様な淡水魚介類を対象とした漁業生産の場であるだけでなく、釣りなどの自然体験活動の場の提供や文化の伝承、自然環境の保全など多面的機能を発揮し、豊かな生活の形成に大きく寄与している。その一方で、近年世界的に高まる水産資源の需要による乱獲や水質汚染の影響により、持続可能な漁業資源割合は1974年は90%だったものが2017年は65.8%と減少し続けており[1]、水産資源は枯渇しつつある。特に内水面は海面と比べて豊度が低く、立地条件等により水産動植物の採捕が容易であることから、資源が減少する可能性が高い。また、内水面は様々な問題に直面しており、内水面漁業生産量は、昭和63年の13万8千トン进行ピークに、内水面養殖生産量は昭和63年の9万9千トン进行ピークに内水面漁業の生産量は減少傾向にある[2] (Figs. 1-2)。内水面漁業の課題の1つにアユ漁獲量の低下がある。



Fig. 1 内水面漁業生産量の推移

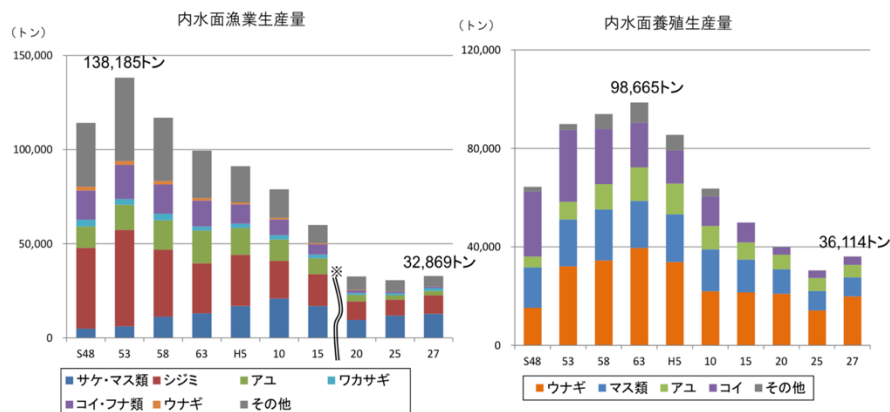


Fig. 2 内水面漁業生産量の推移 (魚種)

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は上品な香りから香魚と呼ばれ、万葉集の季語に用いられるほど古来より日本人に親しまれてきた。秋に産卵を行い、二週間ほどで孵化、海に下り成長した後に生まれた川に戻り、産卵して生涯を閉じる年魚である。1913年に石川千代松博士(1860-1935)は、サイズの違いから海産アユと別種と考えられていた琵琶湖産の小鮎を琵琶湖内の藻類等の餌不足が起因であると推測し、東京の多摩川に放流し立派に成育させ、放流事業及び養殖事業の礎を築いた。海産稚鮎の成育は1929年に神奈川県海産稚鮎を用いて農林水産試験場にて中野宗治技師により成功している。その後、高度経済成長による需要の増加に伴い、アユ漁業は発展してきた[3]。しかし、アユの漁業生産量のピークは1991年の約1万8千トンであり内水面漁業生産量の2割を占めていたが、2015年には約2千トンとなり、内水面漁業生産量に占める割合も1割以下となっている(Fig. 3)。養殖においてもピークは1988年の約1万4千トンであり、2015年には約5千トンとなっている (Fig. 4)。

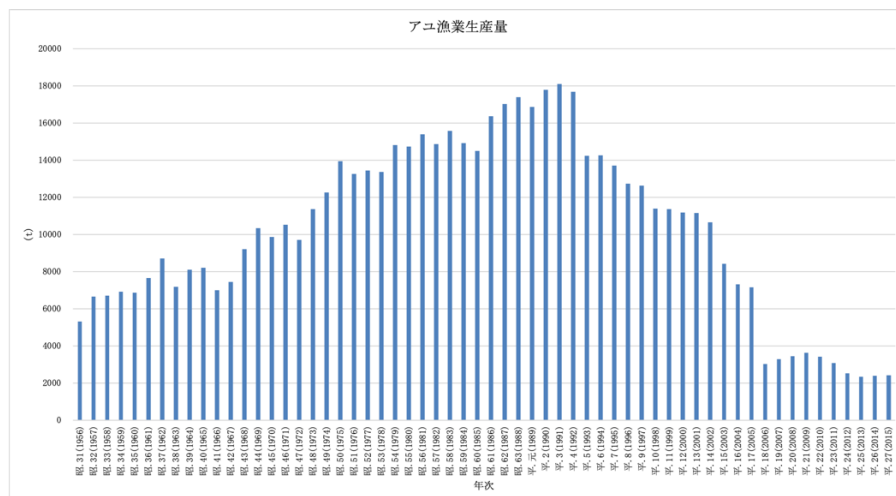


Fig. 3 アユ漁業生産量 (内水面漁業・養殖業魚種別生産量累年統計を元に作製)

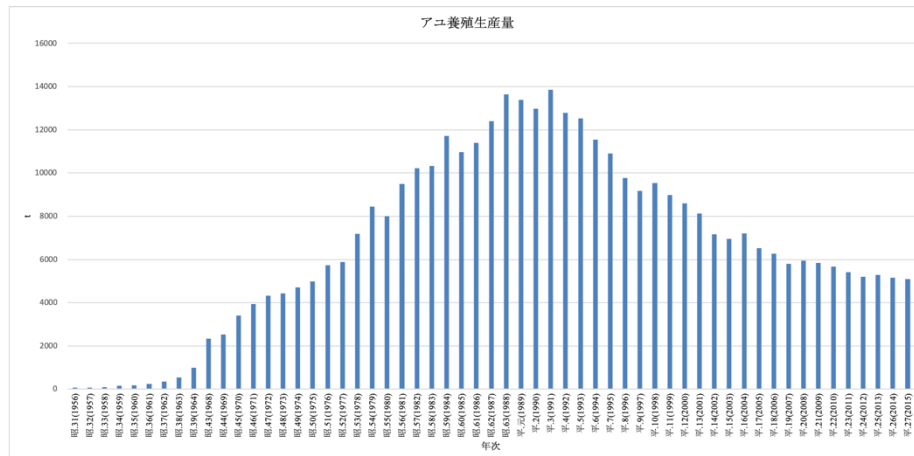


Fig. 4 アユ養殖生産量(内水面漁業・養殖業魚種別生産量累年統計を元に作製)

魚類感染症である冷水病がアユの生産量低下の原因の1つとなっている。アユは病原微生物への抵抗性が低いことが知られており、特にグラム陰性長桿菌 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする冷水病は漁協や自然資源に多大な損失をもたらすとして問題視されている。2007年3月に閣議決定された水産基本計画においても内水面漁業、養殖業における課題の1つとして位置付けられ、疾病対策の推進により対応することとされている。アユの生息水域は全国680水域であり、2007年における全国のアユ冷水病発生状況は病原体分離等により生息水域全体の21.2% (33県144水域)で確認された[4]。

養殖場においては全国325箇所(2007年)あるうち、発生率は33.5%(22県109箇所)であった[4]。多摩川においても2000年に実施した調査では放流用種苗の23%、放流後河川で回収した死亡魚の70%に冷水病外観症状が観察され、冷水病による減耗が不漁に関与していることが示唆された[5]。冷水病の起源は北米のマス病気と言われており、低水温期の稚魚に発生し、死亡率が高いことから“bacterial cold water disease”と呼ばれていたため日本では冷水病と呼ばれている。日本ではギンザケ、ニジマスに1985年ごろから見られ、アユでは徳島県の養殖場で発生し、アユの放流をきっかけに全国に広がったとされる。オイカワを始め、アナゴ、ヤマメ、イワナ、ギンブナ、ウグイ、ウナギなど淡水魚全般の感染が報告されており、感染すると鰓・肝臓・腎臓の貧血、体表の白濁、下顎の出血他、体表の穴あき症状[6]などを示す事の特徴とするが、感染しても症状が認められないこともある。冷水病菌は血液凝固の際に形成されるフィブリンを分解する酵素を産生する事から病変が治癒しにくく、出血に繋が

ると考えられる[4]。原因菌である *F. psychrophilum* は長さ 1.5–7.5 μm であり、滑走運動能力が極めて弱く、発育は遅い。寒天平板状に黄色いコロニーが形成される。

現在の冷水病の対策は温水による加温処理 (23 °C で温度上昇にアユを馴致し 28°C の加温処理で *F. psychrophilum* に対し効果を示す)、ワクチン、医薬品投与が有効とされているが、温水による加温処理では水温を 28°C まで上昇させるのは経済的負担が大きく、温度ストレス・酸欠・水質悪化・他の疾病の発生などを誘発することによりアユが死亡する可能性がある。ワクチンによる予防では、アユ体内にワクチンが残留する問題や、稚魚にワクチンを打つ技術がないことなど、有効性も低い為実用レベルにあるものはない。現在最も有効とされているのは医薬品投与であり、上市されているのはスルフィソゾールナトリウム(武田薬品:イスラン®ソーダ) 1 剤のみである[4]。スルフィソゾールナトリウム (Fig. 5) はサルファ剤の一種であり、環境に流出してしまうと環境中の細菌に対して効果を示してしまう恐れがある。また、耐性菌出現報告例[8]もあることから、環境に配慮した新たな抗冷水病医薬品の開発が求められている。

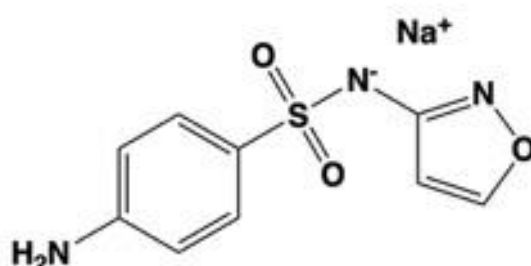


Fig. 5 スルフィソゾールナトリウムの構造

新たな抗冷水病治療薬の探索源として筆者は真菌類に着目した。1929年、フレミングにより青カビ *Penicillium chrysogenum* (当時は *P. notatum*) から世界初の抗生物質 penicillin が発見され[9]、1940年にはフローリーとチェインにより penicillin 類の単離が行われた。その後 penicillin の単離法の改良や生産性がより高い菌株の探索が行われ、1942年には penicillin G が単離実用化されたことで人類を多くの感染症から救った。このことは感染症の臨床治療を一変させ、微生物由来天然物からの抗生物質の開発が飛躍的に進むこととなった。こうして菌類、とりわけ糸状菌は天然物探索における重要な微生物資源として今日に至るまで精力的に研究され、数多くの医薬・動物薬・農薬が開発されてきた。当研究所ではこれまで糸状菌を中心とした菌類の持つ能

力を活用し、ヒトや動物の感染症の治療および予防、また人類の健康・自然環境維持のために創出する医薬・動物薬・農薬のリード化合物を産生する多種多様な糸状菌（菌類）を自然環境から収集してきた。当研究所で発見された新規化合物の1つに Virgaricin (Fig. 6) [10]がある。生産菌は *Virgaria boninensis* (Fig. 7)[10]であり、*B. subtilis* に対して活性がある。

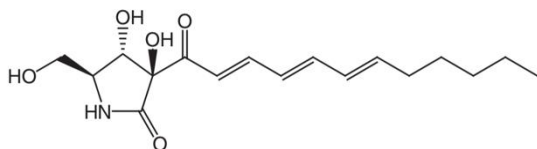


Fig. 6 Virgaricin の構造

冷水病の原因菌である *F. psychrophilum* はアユなどの淡水魚だけ

でなく、河川の水や底石、藻などからも検出される。微生物は、同じ環境中で拮抗する他の微生物に対して抗菌活性物質を生産すると考えられている。また、生物と共生する微生物が宿主の身を守るような抗菌物質を生産したという報告がある[11]。そこで水中に根を張る水生植物の根圏付近では *F. psychrophilum* から宿主、または自身を守るために抗菌物質を生産している可能性が高いと考えた。上記の考えから抗 *F. psychrophilum* 活性物質を探索するための微生物分離源として、水生植物を選択した。多摩川流域では *F. psychrophilum* 感染アユ個体が確認されていることから、多摩川流域に生息する水生植物を地点別に採取し、それぞれから真菌類の分離を行う[5]。分離した菌株を4つの異なる主成分を持つ培地で培養し、微生物培養抽出物を作製し、評価用サンプルとする。*Flavobacterium psychrophilum* に対する天然物を用いた創薬スクリーニングは未だかつて実施例の報告はないため、*F. psychrophilum* に対する *in vitro* 評価系の確立を行う。

Flavobacterium psychrophilum に対して活性評価試験を行い、化合物の単離、構造決定を行い、冷水病治療薬の創薬を目指す。

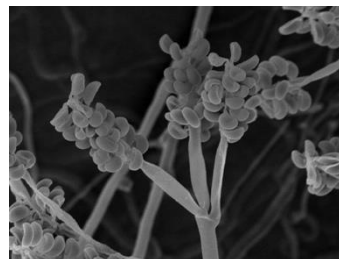


Fig. 7 *Virgaria boninensis*

本論

1章 水生植物からの真菌類の分離・同定・培養液作製

水生植物サンプルより希釈平板法を用いて真菌の分離を行い、遺伝子解析に基づく属の推定を行った。分離された水生植物由来真菌類を用いて微生物培養液を作成した。

1-1. 水生植物のサンプリング

1-1-1. サンプリング地点・方法

多摩川流域では *F. psychrophilum* 感染アユ個体が確認されていることから、多摩川流域に生息する水生植物をサンプリング対象とした。上流では東京都西多摩郡奥多摩町三ツ釜の滝 (Fig. 8 A)、青梅市釜の淵公園 (Fig. 8 B) の2地点、中流では国立市府中用水取水樋門 (Fig. 8 C) よりサンプリングを行った。水中に根、または葉が存在する水生植物・藻類を対象とし、外気に触れぬようにプラボトルを用いて河川の水と一緒に採集した。

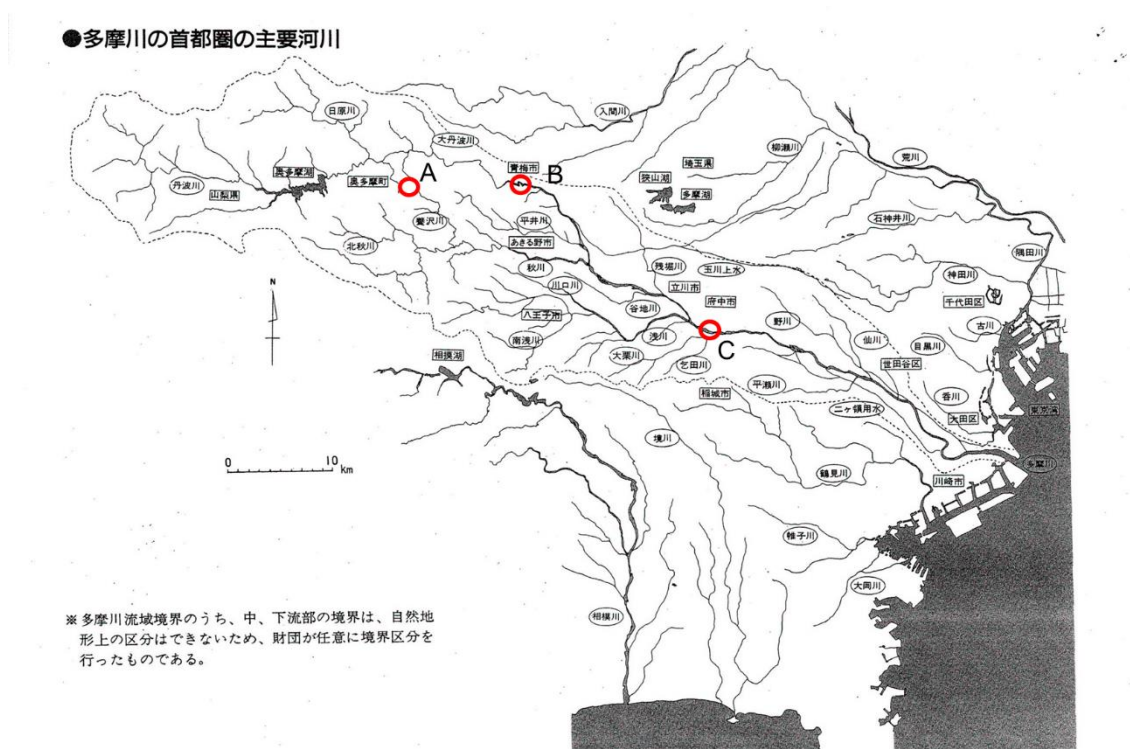


Fig. 8 サンプリング地点

1-1-2. 水生植物の遺伝子解析による同定

得られた水生植物は植物のバーコード遺伝子である ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase (rbcL) 遺伝子領域の塩基配列解析及び形態観察により属の推定を行なった。水生植物からの DNA の抽出から配列決定・BLAST を用いた遺伝子解析による同定の流れを以下に示す。

① DNA 抽出

水生植物サンプル 100 mg を 1.5 mL マイクロチューブに入れ、液体窒素を加え沸騰させる。再度液体窒素を加えて沸騰させ、1.5 mL マイクロチューブにペッスルを入れ冷やす。液体窒素が蒸発する直前にペッスルで水生植物サンプルを磨り潰す。粉碎したサンプルに Buffer AP1 を 400 μ L、RNase を 4 μ L 加え、vortex を用いて攪拌する。10 分間 65 $^{\circ}$ C でインキュベートし、2 分ごとに軽く攪拌する。遠心後 P₃ (Buffer AP2) を 130 μ L 加え、氷上に 5 分間の静置後、14,000 rpm で 5 分間遠心を行う。上澄み 300 μ L を QIA カラムに移し 14,000 rpm で 2 分間遠心を行う。落液に Buffer AW1(AP3/E) を 450 μ L 加え白カラムに移し 10,000 rpm で 1 分間遠心を行う。落液および Collection tube を捨てて新しい Collection tube に変え、カラムに Buffer AW2(AW) を 500 μ L 加え 10,000 rpm で 2 分間遠心を行う。落液、Collection tube を捨ててカラムに 65 $^{\circ}$ C に熱した Buffer AE を 80 μ L 加え 5 分間室温で静置後、10,000 rpm で 1 分間遠心を行う。上清を gDNA とした。

② 目的遺伝子領域の増幅

調製した gDNA を用い、QIAGEN Fast Cycling PCR Kit で目的遺伝子領域の増幅を行った。目的遺伝子は植物の標準的バーコード領域である rbcL 領域とし、プライマーは rbcLa_F 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' rbcLa_R 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'を用いた。Polymerase chain reaction (PCR) 反応液 (Table 1) を調製し、サーマルサイクラー PCR Verity 96-well thermal cyler を用いて下記の反応条件 (Scheme 1) で PCR を行った。

Table 1 PCR 反応液組成

試薬・サンプル	用量
RNase free water	9.2 μ L
Fast PCR Master Mix	10 μ L
Primer forward (100 pM)	0.2 μ L
Primer reverse (100 pM)	0.2 μ L
Template DNA	0.4 μ L
計	20 μ L

工程	温度・時間
Template DNA の熱変性	95°C・60 秒
熱変性	96°C・5 秒
プライマーのアニーリング	50°C・5 秒
伸長反応	68°C・21 秒
最終伸長反応	72°C・60 秒
	4°C・ ∞

Scheme 1 rbcLa 領域の PCR 反応条件

③ PCR 産物の精製

QIAquick, PCR DNA Purification Kit を用いて精製した。スピンカラムに PCR 産物と 5 倍量の高塩濃度バッファーを加え、シリカメンブレンに DNA を結合させた状態で 13,000 rpm で 1 分間遠心した。次に、洗浄バッファーを加え同様に遠心することで夾雑物（プライマー、ヌクレオチド、塩類など）を除去した。最後に、低塩濃度バッファーを加え同様に遠心することで、PCR 産物を溶出した。

④ サイクルシーケンスおよび精製

③ で得た PCR 産物を gDNA として、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてサンガー法によるシーケンス反応を行った。サイクルシーケンス反応液 (Table 2) を調製し、下記の反応条件 (Scheme 2) で PCR を行った。PCR 反応後、SAM 溶液および X-Terminator を加えてボルテックスミキサー-Micro Mixer E-36 で 30 分間振盪することで、BigDye[®] Terminator を除去した。その後 2,370 rpm で 2 分間遠心することで X-Terminator ビーズを完全に沈殿させた。

Table 2 サイクルシーケンス反応液組成

試薬・サンプル	用量
RNase free water	4 μ L
BigDye [®] Terminator v3.1 PreMix	2 μ L
5 × Sequencing Buffer	1 μ L
Primer (5 pM)	0.5 μ L
Template DNA	2.5 μ L
計	10 μ L

工程	温度・時間
Template DNA の熱変性	96°C・60 秒
熱変性	96°C・10 秒
プライマーのアニーリング	50°C・5 秒
伸長反応	60°C・240 秒
	4°C・ ∞

x25 サイクル

Scheme 2 サイクルシーケンス反応条件

⑤ サンガー法シーケンスおよび塩基配列の決定

キャピラリー電気泳動による塩基配列の検出は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer を用いて行った。Lasergene 10 package の Seqman Pro および SeqBuilder を用いて、上流・下流プライマー由来配列のペアワイズアライメントの決定を行い、遺伝子配列を決定した。

⑥ BLAST 検索による属および種の推定

National Center for Biotechnology information (NCBI) の BLASTN2.2.26 [11] を使用し、決定した遺伝子配列の BLAST 検索を行うことで、特定および属の推定を行った。

1-1-3. サンプルング結果

多摩川流域である奥多摩三ツ釜の滝、青梅市釜の淵公園、国立市府中用水取水樋の以上3地点よりサンプルングを行い、水生植物を15種採集した (Table 3)。

Table 3 採集した水生植物 (採集日付順で記載)

採集日	水生植物	採取場所
2020. 6. 20	<i>Eurhynchium praelongum</i>	奥多摩三ツ釜の滝
	<i>Eurhynchium praelongum</i>	
	<i>Entodon flavescens</i>	
2020. 6. 20	<i>Equisetum ramosissimum</i>	青梅市釜の淵公園
	unidentified algae 01	
	unidentified algae 02	
	unidentified algae 03	
2020.11.6	<i>Crucifera</i> sp.	国立市府中用水取水樋門
	<i>Spirogyra</i> sp. 01	
	<i>Spirogyra</i> sp. 02	
	<i>Spirogyra</i> sp. 03	
	<i>Myriophyllum spicatum</i>	
	<i>Cardamine flexuosa</i>	
	<i>Elodea nuttallii</i>	
<i>Egeria densa</i>		

1-2. 真菌類の分離と遺伝子解析による同定

【方法】

1-2-1. 希釈平板法による真菌類の分離

多摩川流域より、採集した真菌類の分離の実施までに日が開かないよう、なるべく速やかに実験に用いた。採集した水生植物を根・葉に分け 1 g 計りサンプルとした。改変 winogradsky 溶液 9 mL で希釈しながら乳ばちですり潰し、懸濁液を作成した。この懸濁液を水生植物サンプルの 10 倍希釈液とした。10 倍希釈液 1 mL を改変 winogradsky 溶液 9 mL で希釈し、100 倍希釈液を調製した。真菌類の分離には、数多くの糸状菌種の生育が期待できるポテトデキストロース寒天培地(Potato Dextrose Agar)、植物病原真菌の培養にも用いられる植物由来成分を含み、植物由来真菌類の生育が期待できるカゴメ野菜ジュース培地、玉ねぎ、にんにくをすりおろして培地に加えたことにより硫黄分を多く含む オニオンガーリック寒天培地 (OGA)[12]の 3 種類の培地に細菌の増殖を抑制する抗生物質カナマイシンとクロラムフェニコールをそれぞれ 100 mg/L、生育の早い真菌類を抑制するローズベンガルを 50 mg/L 添加した培地を用いた (Table 4)。調製したサンプル (100 μ L) を各培地に塗布し、25 $^{\circ}$ C・暗条件下、5 日間培養した。生育したコロニーを純粋培養するために新しい PDA 培地に接種した。さらに、純化したコロニーを保存用の Emerson 斜面培地 (YpSs)、三浦斜面培地 (LcA) に接種したものを純粋培養株として確立した (Fig. 9)。

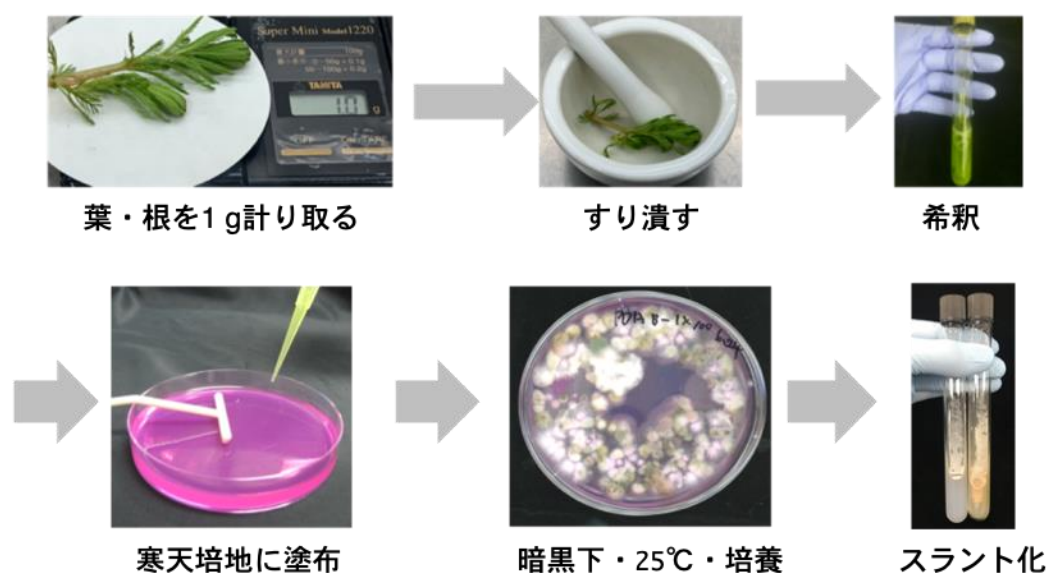


Fig. 9 希釈平板法による真菌類分離の流れ

Table 4 各種培地成分

Onion Garlic Agar		カゴメ野菜ジュース寒天培地	
すりおろしニンニク	2.0%	カゴメ野菜ジュース	200 mL
すりおろしタマネギ	2.0%	CaCO ₃	0.3%
Agar	2.0%	Agar	2.0%
Chloramphenicol	100 mg/L	Chloramphenicol	100 mg/L
Kanamycin	100 mg/L	Kanamycin	100 mg/L
Rose bengal	50 mg/L	Rose bengal	50 mg/L
D.W.		D.W.	
Potato Dextrose Agar			
Difco TM Potato dextrose agar	3.9%		
Chloramphenicol	100 mg/L		
Kanamycin	100 mg/L		
Rose bengal	50 mg/L		
D.W.			

1-2-2. 遺伝子解析および近縁属・種の推定

培養株として確立した真菌類は遺伝子配列を決定し、GenBank データベースを対象に Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行い、相同値から属および種の推定を行った。糸状菌・酵母からの DNA の抽出から配列決定・BLAST を用いた相同値検索の流れを以下に示す。

① DNA 抽出

PDA 培地上で純粋培養した菌体を一部かき取り、Prepman Ultra 液中に懸濁した。100°C で 10 分間の湯煎、室温で 2 分間の静置後、14,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を Template DNA とした。

①'KOD を用いた DNA 抽出

マイクロチューブに TE 溶液 50 μL 分注、PDA 培地上で純粋培養した菌体を一部かき取りマイクロチューブに菌体を入れる。Vortex を行う。

② 目的遺伝子領域の増幅

調製した Template DNA を用い、QIAGEN Fast Cycling PCR Kit で目的遺伝子領域の増幅を行った。目的遺伝子は、糸状菌は Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域、酵母は 26S rRNA 遺伝子の Domain 1/Domain 2 (D1/D2) 領域とし、プライマーは ITS 領域には ITS5 および ITS4 を用いた。Polymerase chain reaction (PCR) 反応液 (Table 5) を調製し、サーマルサイクラー PCR Verity 96-well thermal cycler を用いて下記の反応条件 (Scheme 3) で PCR を

行った。(KOD を用いた場合 Table 6 を用いて PCR を行なった)

Table 5 PCR 反応液組成

試薬・サンプル	用量
RNase free water	9.2 μ L
Fast PCR Master Mix	10 μ L
Primer forward (100 pM)	0.2 μ L
Primer reverse (100 pM)	0.2 μ L
Template DNA	0.4 μ L
計	20 μ L

Table 6 PCR 反応液組成 (KOD)

試薬・サンプル	用量
SDW	7.8 μ L
KOD	10 μ L
Primer forward (100 pM)	0.6 μ L
Primer reverse (100 pM)	0.6 μ L
Template DNA	1 μ L
計	20 μ L

工程	温度・時間
Template DNA の熱変性	95°C・60 秒
熱変性	96°C・5 秒
プライマーのアニーリング	50°C・5 秒
伸長反応	68°C・21 秒
最終伸長反応	72°C・60 秒
	4°C・ ∞

} x35 サイクル

Scheme 3 ITS 領域の PCR 反応条件

③ PCR 産物の精製

QIAquick, PCR DNA Purification Kit を用いて精製した。スピнкаラムに PCR 産物と 5 倍量の高塩濃度バッファーを加え、シリカメンブレンに DNA を結合させた状態で 13,000 rpm で 1 分間遠心した。次に、洗浄バッファーを加え同様に遠心することで夾雑物（プライマー、ヌクレオチド、塩類など）を除去した。最後に、低塩濃度バッファーを加え同様に遠心することで、PCR 産物を溶出した。

④ シーケンス解析

ユーロフィンジェノミクス株式会社 DNA シーケンシングサービス部門にシーケンス解析を外注した。

⑤ BLAST 検索による属および種の推定

National Center for Biotechnology information (NCBI) の BLASTN2.2.26 [13]を使用し、決定した遺伝子配列の BLAST 検索を行うことで、相同性の高い分類群の特定および属の推定を行った。GenBank データベースより、近縁種と推定された種との相同性を比較した。ITS 領域では既知種との相同性が 99% 以下の菌株を近縁種と同属の未知種、90%以下の菌株を未知属（所属不明のため Unknown）とした。また、属や種の同定は Index Fungorum[14]や MycoBank[15]データベースを参照し現行の分類体系に従って行った。

1-2-3. 真菌類分離結果

多摩川上流・中流域より水生植物を 15 種採集し、真菌類を 142 株分離した。142 株は Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域に基づく分子同定により 52 属 71 種に分類した。そのうち 21 株 (14%) が未知種である可能性が示唆された (Fig. 10) [15]。北里番号 FKI-10299~ FKI-10368、FKI-11067~FKI-11138 として供給を行なった (Table 7)。

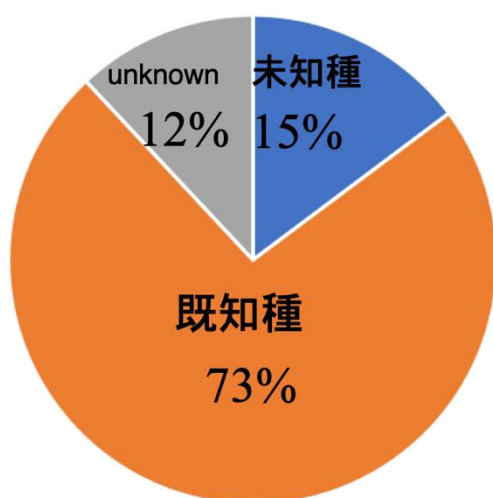


Fig. 10 未知種、既知種の割合

Table 7 水性植物由来真菌株の分類結果

菌株番号	分離日	分離源	推定結果	相同値 (%)	増幅領域
FKI-10299	2020.6.24	<i>Equisetum ramosissimum</i>	<i>Arthrinium malaysianum</i>	97.5%	ITS
FKI-10300	2020.6.24	"	<i>Alternaria destruens</i>	98.3%	ITS
FKI-10301	2020.6.24	"	<i>Cladosporium angustiterminale</i>	100%	ITS
FKI-10302	2020.6.24	"	<i>Didymella rosea</i>	100%	ITS
FKI-10303	2020.6.24	"	<i>Didymella rosea</i>	100%	ITS
FKI-10304	2020.6.24	"	<i>Epicoccum layuense</i>	99.4%	ITS
FKI-10305	2020.6.24	"	<i>Hannaella kunmingensis</i>	95.7%	ITS
FKI-10306	2020.6.24	"	<i>Holtermanniella takashimae</i>	99.5%	ITS
FKI-10307	2020.6.24	"	<i>Mariannaea samuelsii</i>	97.6%	ITS
FKI-10308	2020.6.24	"	<i>Monochaetia sinensis</i>	99.4%	ITS
FKI-10309	2020.6.24	"	<i>Neosetophoma poaceicola</i>	99.1%	ITS
FKI-10310	2020.6.24	"	<i>Paraphoma radicina</i>	99.6%	ITS
FKI-10311	2020.6.24	"	<i>Pestalotiopsis portugallica</i>	100%	ITS
FKI-10312	2020.6.24	"	<i>Sphaerulina rhododendricola</i>	100%	ITS
FKI-10313	2020.6.24	"	<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	100%	ITS
FKI-10314	2020.6.24	"	<i>Trichoderma lixii</i>	100%	ITS
FKI-10315	2020.6.24	<i>Eurhynchium praelongum</i>	<i>Clonostachys rosea</i>	99.2%	ITS
FKI-10316	2020.6.24	"	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	99.8%	ITS
FKI-10317	2020.6.24	"	<i>Fusarium venenatum</i>	97.7%	ITS

FKI-10318	2020.6.24	"		<i>Didymella rosea</i>	99.3%	ITS
FKI-10319	2020.6.24	"		<i>Didymella rosea</i>	99.3%	ITS
FKI-10320	2020.6.24	"		<i>Fusarium nurragi</i>	98.2%	ITS
FKI-10321	2020.6.24	"		<i>Clonostachys rosea</i>	99.%	ITS
FKI-10322	2020.6.24	unidentified algae 01		<i>Pestalotiopsis malayana</i>	98.9%	ITS
FKI-10323	2020.6.24	"		<i>Didymella suiyangensis</i>	99.7%	ITS
FKI-10324	2020.6.24	"		<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	100%	ITS
FKI-10325	2020.6.24	"		<i>Cystofilobasidium macerans</i>	98.1%	ITS
FKI-10326	2020.6.24	"		<i>Didymella suiyangensis</i>	100%	ITS
FKI-10327	2020.6.24	unidentified algae 02		<i>Aureobasidium pullulans</i>	99%	ITS
FKI-10328	2020.6.24	"		<i>Didymella suiyangensis</i>	100%	ITS
FKI-10329	2020.6.24	"		<i>Didymella keratinophila</i>	97.3%	ITS
FKI-10330	2020.6.24	"		<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.7%	ITS
FKI-10331	2020.6.24	"		<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.3%	ITS
FKI-10332	2020.6.24	"		Unidentified	-	ITS
FKI-10333	2020.6.24	unidentified algae 03		Unidentified	-	ITS
FKI-10334	2020.6.24	"		<i>Paraboeremia selaginellae</i>	100%	ITS
FKI-10335	2020.6.24	"		<i>Trichoderma lixi</i>	99.8%	ITS
FKI-10336	2020.6.24	"		<i>Didymella suiyangensis</i>	100%	ITS
FKI-10337	2020.6.24	"		<i>Monochaetia massachusettsianum</i>	94.80%	ITS
FKI-10338	2020.6.24	"		<i>Monochaetia ilexae</i>	99.20%	ITS

FKI-10339	2020.6.24	"	<i>Cladosporium chasmanthicola</i>	100%	ITS
FKI-10340	2020.6.24	"	<i>Pestalotiopsis grevilleae</i>	99.6%	ITS
FKI-10341	2020.6.24	"	<i>Rhodotorula chungnamensis</i>	99.5%	ITS
FKI-10342	2020.6.24	"	<i>Arthrimum malaysianum</i>	97.8%	ITS
FKI-10343	2020.6.24	"	<i>Hyphopichia homilentoma</i>	99.6%	ITS
FKI-10344	2020.6.24	"	<i>Talaromyces pratensis</i>	99.5%	ITS
FKI-10345	2020.6.24	"	Unidentified	-	ITS
FKI-10346	2020.6.24	"	<i>Trichoderma cremeum</i>	98.6%	ITS
FKI-10347	2020.6.24	"	<i>Alternaria doliconidium</i>	100%	ITS
FKI-10348	2020.6.24	"	<i>Monochaetia ilexae</i>	99.7%	ITS
FKI-10349	2020.6.24	"	<i>Alternaria doliconidium</i>	100%	ITS
FKI-10350	2020.6.24	<i>Entodon flavescens</i>	<i>Didymella suiyangensis</i>	100%	ITS
FKI-10351	2020.6.24	"	<i>Didymella rosea</i>	99%	ITS
FKI-10352	2020.6.24	"	<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-10353	2020.6.24	"	<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-10354	2020.6.24	"	<i>Plectosphaerella oratosquillae</i>	99.3%	ITS
FKI-10355	2020.6.24	"	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	100%	ITS
FKI-10356	2020.6.24	"	<i>Phaeosphaeria chiangraina</i>	96.9%	ITS
FKI-10357	2020.6.24	<i>Equisetum ramosissimum</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	99.6%	ITS
FKI-10358	2020.6.24	"	<i>Dothiora cannabinae</i>	98.3%	ITS
FKI-10359	2020.6.24	"	<i>Mucor orantomantidis</i>	86.6%	ITS

FKI-10360	2020.6.24	"	<i>Clonostachys rosea</i>	97.8%	ITS
FKI-10361	2020.6.24	"	<i>Nectria polythalamia</i>	98.2%	ITS
FKI-10362	2020.6.24	"	<i>Clonostachys rosea</i>	98.1%	ITS
FKI-10363	2020.6.24	"	<i>Colletotrichum anthrisci</i>	99.7%	ITS
FKI-10364	2020.6.24	"	<i>Cladosporium chasmanthicola</i>	100%	ITS
FKI-10365	2020.6.24	"	<i>Didymella suiyangensis</i>	99.3%	ITS
FKI-10366	2020.6.24	"	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100%	ITS
FKI-10367	2020.6.24	"	<i>Neomicrosphaeropsis tamaricicola</i>	97.7%	ITS
FKI-10368	2020.6.24	"	<i>Alternaria doliconidium</i>	100%	ITS
FKI-11067	2020.11.10	<i>Crucifera</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11068	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11069	2020.11.10	"	<i>Apiotrichum</i> sp.	100%	ITS
FKI-11070	2020.11.10	"	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp.	99%	ITS
FKI-11071	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11072	2020.11.10	"	<i>Aaosphaeria arxii</i>	99%	ITS
FKI-11073	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11074	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11075	2020.11.10	"	<i>Pyrenochaetopsis microspora</i>	99%	ITS
FKI-11076	2020.11.10	"	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100%	ITS
FKI-11077	2020.11.10	"	<i>Aspergillus</i> sp.	100%	ITS
FKI-11078	2020.11.10	"	Unidentified		ITS

FKI-11079	2020.11.10	"		<i>Setophaeosphaeria</i> sp.	100%	ITS
FKI-11080	2020.11.10	"		<i>Fusarium chlamydosporum</i>	99%	ITS
FKI-11081	2020.11.10	"		<i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	99%	ITS
FKI-11082	2020.11.10	<i>Spirogyra</i> sp. 01		<i>Penicillium chermesinum</i>	99%	ITS
FKI-11083	2020.11.10	"		Unidentified	-	ITS
FKI-11084	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11085	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11086	2020.11.10	"		<i>Aspergillus</i> sp.	100%	ITS
FKI-11087	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	99%	ITS
FKI-11088	2020.11.10	"		Unidentified	-	ITS
FKI-11089	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11090	2020.11.10	<i>Spirogyra</i> sp. 02		<i>Apiotrichum laibachii</i>	100%	ITS
FKI-11091	2020.11.10	"		<i>Penicillium</i> sp.	100%	ITS
FKI-11092	2020.11.10	"		<i>Aspergillus</i> sp.	100%	ITS
FKI-11093	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11094	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11095	2020.11.10	"		<i>Trichosporon</i> sp.	100%	ITS
FKI-11096	2020.11.10	"		Unidentified	-	ITS
FKI-11097	2020.11.10	<i>Spirogyra</i> sp. 03		<i>Aspergillus</i> sp.	100%	ITS
FKI-11098	2020.11.10	"		<i>Aspergillus</i> sp.	100%	ITS
FKI-11099	2020.11.10	"		<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS

FKI-11100	2020.11.10	"	<i>Fusarium oxysporum</i>	99%	ITS
FKI-11101	2020.11.10	"	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99%	ITS
FKI-11102	2020.11.10	"	<i>Dialonectria ullevolea</i>	91%	ITS
FKI-11103	2020.11.10	"	<i>Hypocreales</i> sp.	89%	ITS
FKI-11104	2020.11.10	"	<i>Geotrichum</i> sp.	100%	ITS
FKI-11105	2020.11.10	"	<i>Hypocreales</i> sp.	88%	ITS
FKI-11106	2020.11.10	"	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	ITS
FKI-11107	2020.11.10	"	<i>Curvularia trifolii</i>	100%	ITS
FKI-11108	2020.11.10	"	<i>Geotrichum candidum</i>	99%	ITS
FKI-11109	2020.11.10	"	<i>Fusarium</i> sp.	99%	ITS
FKI-11110	2020.11.10	<i>Myriophyllum spicatum</i>	<i>Pithomyces cynodontis</i>	99%	ITS
FKI-11111	2020.11.10	"	<i>Leptosphaeria</i> sp.	100%	ITS
FKI-11112	2020.11.10	<i>Cardamine flexuosa</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	100%	ITS
FKI-11113	2020.11.10	"	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	100%	ITS
FKI-11114	2020.11.10	"	<i>Aspergillus</i> sp.	99%	ITS
FKI-11115	2020.11.10	"	<i>Lecythophora</i> sp.	99%	ITS
FKI-11116	2020.11.10	"	<i>Aspergillus giganteus</i>	100%	ITS
FKI-11117	2020.11.10	"	<i>Lecythophora</i> sp.	100%	ITS
FKI-11118	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11119	2020.11.10	"	<i>Aspergillus lentulus</i>	99%	ITS
FKI-11120	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS

FKI-11121	2020.11.10	<i>Elodea nuttallii</i>	<i>Scolecobasidium</i> sp.	99%	ITS
FKI-11122	2020.11.10	"	<i>Apiotrichum</i> <i>l</i> <i>aibachii</i>	100%	ITS
FKI-11123	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11124	2020.11.10	"	<i>Trichoderma</i> sp.	100%	ITS
FKI-11125	2020.11.10	"	<i>Geotrichum</i> sp.	100%	ITS
FKI-11126	2020.11.10	"	<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>	99%	ITS
FKI-11127	2020.11.10	"	<i>Galactomyces pseudocandidum</i>	99%	ITS
FKI-11128	2020.11.10	"	<i>Apiotrichum laibachii</i>	100%	ITS
FKI-11129	2020.11.10	"	<i>Trichoderma virens</i>	100%	ITS
FKI-11130	2020.11.10	<i>Egeria densa</i>	<i>Talaromyces annesophieae</i>	100%	ITS
FKI-11131	2020.11.10	"	<i>Rhinoctadiella similis</i>	100%	ITS
FKI-11132	2020.11.10	"	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100%	ITS
FKI-11133	2020.11.10	"	<i>Penicillium</i> sp.	100%	ITS
FKI-11134	2020.11.10	"	<i>Chaetomium biapiculatum</i>	100%	ITS
FKI-11135	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11136	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS
FKI-11137	2020.11.10	"	<i>Trichoderma bannaense</i>	96%	ITS
FKI-11138	2020.11.10	"	Unidentified	-	ITS

1-3. 水生植物由来真菌類培養液の作製

【方法】

1-3-1. 種培養

GP seed 培地を大試験管に 10 mL ずつ分注し、湿熱滅菌 (121°C、20 分) を行った。種培養植菌する菌量を統一するために、先述した種同定を行った水生植物由来真菌類純粋培養株を GP seed 培地に 1 白金耳ずつ植菌し、300 rpm、27°C、3 日間振盪培養を行った。

1-3-2. 生産培養

調製した各培地 (F8、F8QA、F38) を大試験管に 10 mL ずつ分注し、湿熱滅菌 (121°C、20 分) を行った。F8QA 培地に含まれる QA は熱による変性を防ぐため、蒸留水で 300 mg/mL に調製してろ過滅菌し、終濃度 1%となる様に添加した。F36 培地に用いるハナマサ米は事前に 2 時間に水に浸したものをを用いた。50 mL 遠沈管にハナマサ米を 5.0 g ずつ入れ、昆布茶を 0.5 mL ずつ分注し、湿熱滅菌 (121°C、20 分) を行った。

1-3-3. スクリーニング用微生物培養抽出物の調製

各生産培地にピペットマンを用いて 1%植菌(F36 培地のみ 5%)し、後述する培養期間に従って生産培養を行った。培養後、EtOH を添加し、振盪しながら 2 時間抽出を行い、小試験管に分注した。分注後、遠心 (3,000 rpm, 4°C, 10 分) を行ったものをスクリーニングブロスとした。F8、F8QA 培地 (10 mL, 27°C, 300 rpm) で 6 日間振盪培養後、培地と等量の EtOH (10 mL) を添加した。F36 培地 (5 g/tube) 室温、静置培養で 13 日間培養後、EtOH (20 mL) を添加した。F38 培地 (10 mL, 27°C, 300 rpm) で 3 日間振盪培養後、10 日間の静置培養を行った。その後培地と等量の EtOH (10 mL) を添加した。調製した各スクリーニングブロスは小試験管に分注し、遠心 (3,000 rpm 4°C, 10 分) 後、冷蔵庫 (4°C) にて保管した。

2 章 冷水病菌に対する活性評価系の構築

2-1. *Flavobacterium psychrophilum* の評価に用いる評価方法の検討

冷水病における創薬研究はアユ等を用いた水産試験場における in vivo 試験が一般的である。*Flavobacterium psychrophilum* に対する天然物を用いた創薬スクリーニングは未だかつて実施例の報告はなく、*F. psychrophilum* に対する簡便な生物活性評価方法の構築が必要である。*Flavobacterium psychrophilum* は温度変化に弱く、23 °Cで *F. psychrophilum* のプロテアーゼ生産能に変化が生じる [16]。さらに発育が遅く滑走運動能力が極めて弱い為、個体培地での培養が難しい。そのため、固体培地を使用するペーパーディスク法 (ペーパーディスクに抗菌活性評価を行う溶液を添加し、検定菌を含む固体培地に置き培養したのち、生育阻止円の大きさ等で評価する方法) は適切でないと考えた。また、*F. psychrophilum* は液体培地での生育は良好である。そこで本研究では 96 well plate を用いた液体培養法における活性評価系の構築を目的とし、条件検討を行なった。評価方法検討は CLSI M38 3rd Edition を参考に評価系を構築した。

2-2. 抗 *Flavobacterium psychrophilum* 評価方法の条件検討

NBRC より *F. psychrophilum* NBRC 100250 を購入し、*F. psychrophilum* 培養条件の検討、生物活性評価方法の検討、増殖曲線作成、溶解溶媒、添加サンプル量、ポジティブコントロールの検討実験を行った。

2-2-1. *F. psychrophilum* 培養条件の検討

Cytophaga 培地を用いて培養していたが、コロニーが出現しないなど、安定的な培養が出来ていなかった。そのため条件の良い FLP 培地を参考文献[17]より選択した (Fig.11 , Table 8)。FLP 培地はグルコースを添加したトリプトン酵母エキス-塩類 (TYES) である。グルコースによる増殖促進の作用機序は判明していない。FLPA 培地、Cytophaga 寒天培地、TYESA 培地で *F. psychrophilum* の培養を行った結果、FLPA 培地のみコロニーが出現したため、FLP 固体培地と FLP 液体培地を用いて *F. psychrophilum* の培養を行う。

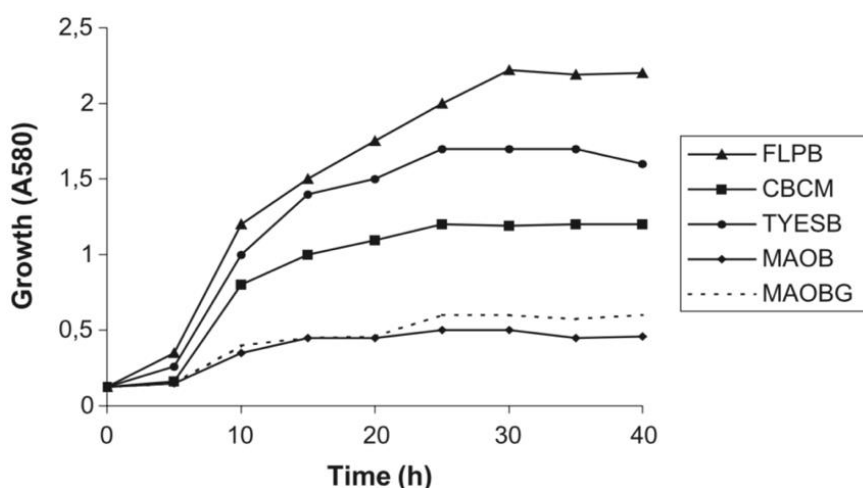


Fig. 11 各種培地を用いた *F. psychrophilum* の増殖曲線[17]

FLPB	
Bacto Tryptone	0.40%
Yeast extract	0.04%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
Glucose	0.05%
pH 7.2-7.4	

Cytophaga	
Bacto Tryptone	0.05%
Yeast extract	0.02%
Beef extract	0.02%
Sodium acetate	0.02%
pH 7.2-7.4	

FLPA	
Bacto Tryptone	0.40%
Yeast extract	0.04%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
Glucose	0.05%
Agar	1.00%
pH 7.2-7.4	

TYESB	
Bacto Tryptone	0.40%
Yeast extract	0.04%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
pH 7.2-7.4	

CBCM	
Bacto Tryptone	0.05%
Yeast extract	0.02%
Beef extract	0.02%
Sodium acetate	0.02%
Glucose	0.05%
Galactose	0.05%
Rhamnose	0.05%
Skimmed milk	0.05%
pH 7.2-7.4	

MAOBG	
Bacto peptone	0.50%
Yeast extract	0.05%
Sodium acetate	0.05%
Glucose	0.05%
pH 7.2-7.4	

MAOB	
Bacto peptone	0.50%
Yeast extract	0.05%
Sodium acetate	0.05%
pH 7.2-7.4	

Table 8 各種培地成分

2-2-2. 生物活性評価方法の検討

Flavobacterium psychrophilum に対する生物活性評価方法としてペーパーディスク (混釈法、平板塗布法)、96 well plate を用いた液体培養法の 3 種を候補とした。*Flavobacterium psychrophilum* は滑走運動能力が極めて弱く、固体寒天培地での発育が遅いという特徴がある。固体培地を用いて培養を行なった結果、安定的な培養ができなかった。さらに、*F. psychrophilum* は温度変化に弱く、23 °C で *F. psychrophilum* のプロテアーゼ生産能に変化が生じる[16]。温度変化が大きく培養が難しい固体培地を用いるペーパーディスク法 (ペーパーディスクに抗菌活性評価を行う溶液を添加し、検定菌を含む固体培地に置き培養したのち、生育阻止円の大きさ等で評価する方法) は適切でないと考えた。*F. psychrophilum* は液体培地での生育は良好である。その為、96 well plate を用いた液体培養法により活性評価を行う事とした。

2-2-3. 増殖曲線作成

2-2-1, 2-2-2 より、FLPB 培地を用いて *F. psychrophilum* を 96 well plate で評価する事が最適と考え、*F. psychrophilum* に対する生物活性評価を行う際の増殖曲線を求めることにした。マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 600 nm で 5 時間ごとに計測、縦軸を吸光度、横軸を時間 (h) でプロットし、細菌の増殖曲線を作成する。吸光度 E は 溶液の厚さ=l、溶液の密度=c に依存する (Lambert & Beer の法則)[18]。溶液の厚さ=セルの光路長 は一定なので吸光度は密度に比例し、吸光度の数値上昇は細菌の増殖を示す。

20 時間まで計測を行ったが吸光度に変化がなかった。

そこで、20 時間以上を詳細に計測するために培養 20 時間までを 10 時間、20 時間以降を 5 時間ごとに吸光度を計測した。*Flavobacterium psychrophilum* 継代 FLPA 培地から *F. psychrophilum* を 1 白金耳かきとり、大試験管 (FLPB 培地 10 mL) 一本に懸濁し、静置条件で 18°C、2 日間種培養した。デンストメーター ($\lambda=565\pm 15\text{nm}$) を用いて *Escherichia coli* ATCC 25922 株を標準菌株として菌濃度を推定した結果、 2.4×10^8 cells/mL の種培養液を得た。得られた種培養液を FLPB 培地を用いて 10 倍ずつ段階希釈し、 2.4×10^6 cells/mL とした。各 well に FLPB 培地を 100 μL 分注し、 2.4×10^6 cells/mL の種培養液を各 well に 100 μL 加え、計 200 μL とした。マイクロプレートリーダー使用時のコンタミネーションを防ぐために、96 well plate にプレート用シール (Breathable Type) を貼り各時間ごとにカッターでシールを切り吸光度を測定した。事前検討により 20 時間までは吸光度測定値の上昇が確認できないことから 20 時間までは 10 時間ごとの測定とした。50 時間、吸光度平均 0.196 で沈殿を確認した。培養時間を暫定 50 時間とした (Fig. 12)。

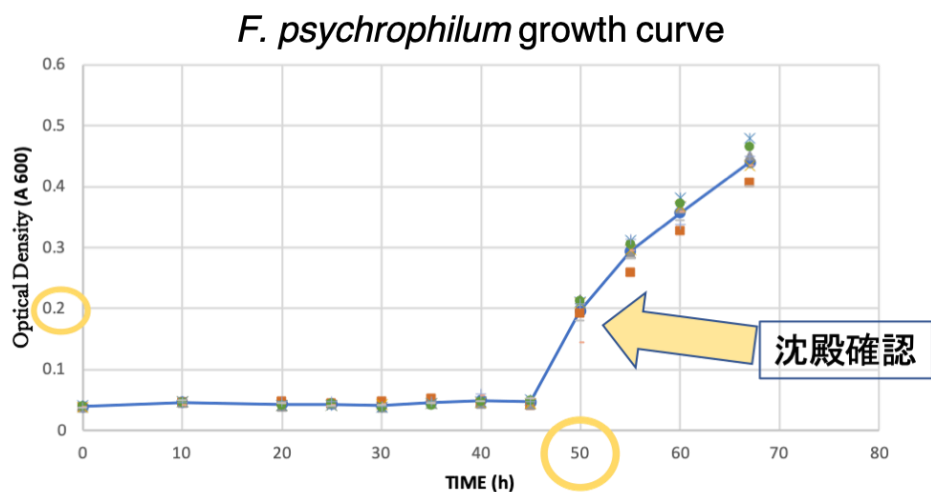


Fig. 12 *F. psychrophilum* 増殖曲線

2-2-4. 溶解溶媒の検討

微生物培養液を 96 well プレートに分注し、乾固した後に微生物培養液を再溶解する際に用いる溶媒の検討を行った。活性評価を行う際に *F. psychrophilum* の培養に影響を及ぼさないものを最適溶媒とする。事前検討では、DMSO 5% (DMSO 10 μ L、FLPB 培地 90 μ L、菌液 100 μ L) で *F. psychrophilum* は死滅し増殖が確認できなかった為、他の溶媒を検討することとした。増殖曲線作成と同様の条件 2.4×10^6 cells/mL の種培養液を用いた。種培養液を 100 μ L、溶媒の濃度を 5%、4%、3%、2%、1%、0.5%とし、溶媒の濃度に合わせて FLPB 培地を加え、計 200 μ L とした。無処理コントロールの well には FLPB 培地 100 μ L、菌液 100 μ L とし、2-2-3 増殖曲線作成と同様に 50 時間で沈殿が確認された。溶媒には DMSO、ethanol、methanol、10%DMSO (MQ で希釈)、を選出した。静置条件で 18°C、50 h 培養し、吸光度 (600 nm) で測定、細菌に対する溶媒活性試験を行い、阻害率を算出した (Table 9)。DMSO では 2%でも 81%生育阻害してしまうため、5%濃度でも *F. psychrophilum* の生育に影響を及ぼさなかった。Methanol を溶媒として用いることとした。

Table 9 各溶媒における増殖阻害率

溶媒終濃度	DMSO	Ethanol	Methanol	10%DMSO
5%	81%	26%	0%	0%
4%	84%	0%	0%	4%
3%	84%	5%	15%	6%
2%	81%	6%	9%	8%
1%	60%	8%	15%	10%
0.50%	20%	7%	13%	6%

2-2-5. 添加サンプル量の検討

各種培地成分による *F. psychrophilum* の増殖への影響を調べ、添加サンプル量の検討を行った。5種類の培地コントロールを 96 well Plate に 10 μ L、50 μ L 添加し、乾固した。2-2-4. 溶解溶媒の検討で決定した methanol 10 μ L で再溶解し、FLPB 培地 90 μ L、*F. psychrophilum* 種培養液 100 μ L を加え、静置条件で 18°C、50 h 培養した。次に吸光度 (600 nm) で測定し、阻害率を算出した (Table 10)。F8QA 培地、F8hy では 50 μ L で評価したところそれぞれ 78%、24%と増殖阻害を示してしまった。そこで各培地 10 μ L では *F. psychrophilum* の増殖を阻害しないことから添加サンプル (微生物培養液) は 10 μ L とした。

Table 10 各培地成分による増殖阻害率

溶媒終濃度	F8	F8QA	F8Hy	F36	F38
10 μ L	5%	0%	0%	0%	0%
50 μ L	6%	78%	24%	0%	30%

2-2-6. ポジティブコントロールの検討

既存薬であるスルフィソゾールナトリウムをポジティブコントロールとする。各濃度のスルフィソゾールナトリウムを 96 well plate に 10 μ L 分注、増殖曲線作成と同様の条件で培養を行い、活性評価を行なった (Table 12)。3 μ g/mL、1 μ g/mL で抗菌活性が確認できたため、ポジティブコントロールにはスルフィソゾールナトリウム 終濃度 1 μ g/mL を用いることとした。

Table 11 各スルフィソゾールナトリウム濃度における増殖阻害率

	3 μ g/mL	1 μ g/mL	0.3 μ g/mL
増殖阻害率	83%	66%	6%

2-3. 条件検討結果

2-2-6 までで検討した *F. psychrophilum* に対する評価方法の検討結果まとめを以下に示す (Fig. 13)。

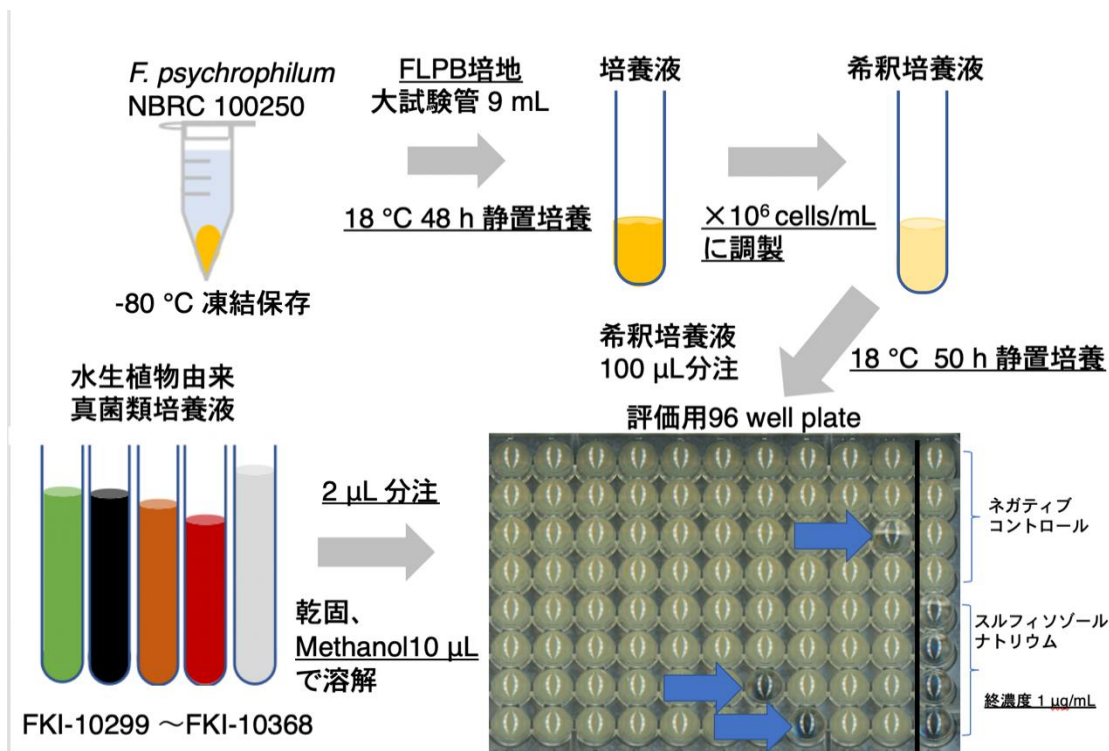


Fig. 13 活性評価方法

これらの結果から -80°C で保存していた*F. psychrophilum*をFLPB培地に1%植菌し 18°C 、48h静置培養した培養液とした。種培養液の550 nmの吸光度から濃度を算出し 1.0×10^6 cells/mL程度の濃度に調整し100 μL 96 well plateに分注した。菌希釈液を分注したwellに評価サンプルを分注し 18°C 、50h静置培養する。50h後、目視で活性を評価した(Fig. 14)。



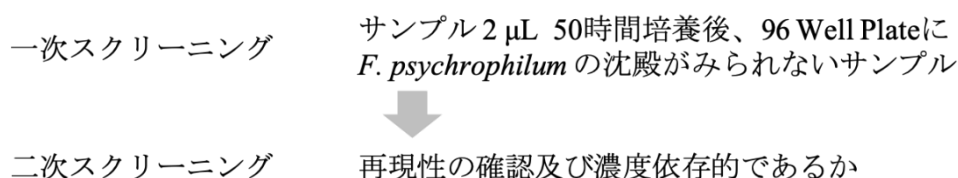
Fig. 14 左 活性あり 中心 活性なし 右 ポジコン (スルフィソゾール Na)

3 章 抗冷水病菌活性スクリーニング

3-1. *F. psychrophilum*に対する活性物質の探索

[方法]

確立した評価系 (Fig. 13) を用いてスクリーニングを行った。1章で分離し、1-3で作成した水生植物由来真菌類培養液を用いて作成した、FKI-10298～FKI-10368 をサンプルとした。スクリーニング通過基準として、構築した *F. psychrophilum* 評価系を用いて50時間後に *F. psychrophilum* の沈殿が認められないサンプルを一次スクリーニング通過とした。二次スクリーニングでは再現性及び段階希釈 (2 μ L, 0.6 μ L, 0.2 μ L, 0.06 μ L/well) を行い濃度依存的に抗菌活性が減弱するサンプルを通過とした。(Table 12)。



Scheme 6 スクリーニング通過基準

3-2. FKI-10298～FKI-10368のスクリーニング結果

FKI-10298～FKI-10368 を用いてスクリーニングを行った。マイクロプレートリーダーを用いて600 nm の吸光度で測定、ネガティブコントロールと比較して阻害率を算出し、二次スクリーニングにおける濃度依存の指標とした。

計算式 $=100 - (\text{測定数値} \times 100 / \text{ネガティブコントロールの平均}) \%$

スクリーニング結果をtable 13に示した。3-1で作成した水生植物由来糸状菌培養液サンプルを構築した *F. psychrophilum* 評価系で評価したところ30サンプルが1次スクリーニングを通過した。1次スクリーニングを通過した30サンプルに関して2次スクリーニングを実施した結果、21サンプルが通過した。通過したサンプルの詳細データをTable 13に示した。ヒットしたサンプルの属として *Trichoderma* (3)、*Aureobasidium* (4)、*Altermaria* (3) が特に重複していた。

Table12 スクリーニング通過サンプル

株名	培地	属名	種小名	阻害率	株名	培地	属名	種小名	阻害率
FKI-10310	F36	<i>Trichoderma</i>	<i>lixii</i>	86%	FKI-10347	F38	<i>Alternaria</i>	<i>doliconidium</i>	81%
FKI-10317	F36	<i>Fusarium</i>	<i>venenatum</i>	87%	FKI-10352	F8QA	<i>Trichoderma</i>	<i>sp.</i>	84%
FKI-10318	F38	<i>Didymella</i>	<i>rosea</i>	87%	FKI-10354	F38	<i>Plectosphaerella</i>	<i>oratosquillae</i>	87%
FKI-10321	F8QA	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>	83%	FKI-10360	F36	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>	79%
FKI-10327	F8QA	<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	85%	FKI-10361	F8QA	<i>Nectria</i>	<i>polythalama</i>	80%
FKI-10327	F38	<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	83%	FKI-01363	F8QA	<i>Colletotrichum</i>	<i>anthrisci</i>	85%
FKI-10328	F36	<i>Didymella</i>	<i>suiyangensis</i>	79%	FKI-10364	F8QA	<i>Cladosporium</i>	<i>chasmanthice</i>	64%
FKI-10330	F36	<i>Aureobasidium</i>	<i>namibiae</i>	51%	FKI-10365	F8QA	<i>Didymella</i>	<i>suiyangensis</i>	83%
FKI-10330	F38	<i>Aureobasidium</i>	<i>namibiae</i>	83%	FKI-10368	F36	<i>Alternaria</i>	<i>doliconidium</i>	83%
FKI-10332	F36	Unidentified fungi		86%	FKI-10368	F38	<i>Alternaria</i>	<i>doliconidium</i>	81%
FKI-10335	F36	<i>Trichoderma</i>	<i>Lixii</i>	82%					

4章 抗 *F. psychrophilu* 活性物質の単離精製

4-1. *Trichoderma lixii* 培養物からの *F. psychrophilu* に対する活性物質精製

4-1-1. *T. lixii* FKI-10310 株 F36 培地培養物の

F. psychrophilum に対する活性評価

3章で行なった活性評価の結果で *Trichoderma lixii* FKI-10310 株培養物は *F. psychrophilum* に対してネガティブコントロールと比較して 86%阻害した。また、二次スクリーニングにおいて再現性及び 0.3 倍希釈 (微生物培養液 0.6 μ L 相当)まで活性を示した。

4-1-2. *T. lixii* FKI-10310 株の F36 培地培養物の作製およびエタノール抽出

活性物質の単離精製の為、*Trichoderma lixii* FKI-10310 株の再培養を行なった。FKI-10310 株を GP 培地, (100 mL, 27°C 210 rpm) に 1 白金耳植菌し、3 日間振盪種培養を行なった。培養後の種培養液を米 1 kg (F36 培地) 入れたオートクレーブバックに 5%植菌し、13 日間室温にて静置培養を行なった。その後エタノールを各オートクレーブバックに 1 L ずつ加え抽出し、吸引ろ過にて菌体を取り除きエタノール抽出物を作成した。

4-1-3. *T. lixii* FKI-10310 株 F36 培地培養物の

抗 *F. psychrophilum* に対する活性物質精製の条件検討

活性物質を精製する為に ODS カラム、EtOAC、シリカゲルカラムを用いて条件検討を行なった。

・精製処理前サンプルの作成

小試験管に 3 mL に FKI-10310 培養液を入れエバポレーターで有機溶媒を留去した。留去後、蒸留水で 3 mL メスアップした 1.5 mL マイクロチューブに 1 mL ずつ分注し、精製前処理サンプルとした。

・ODS を用いた条件検討

精製前処理サンプル 1 mL を平衡化した Sep-Pak C18 lights にシリンジで入れ、pass through、30%、70%、100% CH₃CN 各 1 mL ずつ溶出し分画サンプルを作成した。評価する量 (20 μ L)のサンプルを 1.5 mL マイクロチューブに分注しサーバントで濃縮し評価用サンプルとし、10 μ L、3 μ L、1 μ L、0.3 μ L/well で抗菌活性評価を行った。50 μ L を LC/UV バイアルのインサートに入れデシケーターで乾固した。乾固した LC/UV バイアルに 200 μ L の溶媒 (pass through はミリ Q 水、他は MeOH)で再溶解し LC/MS 分析した。

・ EtOAc 抽出を用いた条件検討

精製前処理サンプル 1 mL を 2 本のエッペンに入れ、それぞれ EtOAc 1 mL を加えボルテックスで攪拌後静置し有機層と水層に分けた。有機層を 1 mL ずつ分け EtOAc 抽出用と silica gel 分画用に分けた。評価する量 (20 μ L) のサンプルを 1.5 mL マイクロチューブに分注しサーバントで濃縮し評価用サンプルとし、4-3-2 と同様希釈したサンプルを用いて抗菌活性評価を行った。50 μ L を LC/UV バイアルのインサートに入れデシケーターで乾固した。乾固した LC/UV バイアルに 200 μ L の溶媒 (水層はミリ Q 水、有機層は MeOH) で再溶解し LC/MS 分析をした。

・ silica gel を用いた条件検討

EtOAc 抽出で分けた silica gel 分画用 EtOAc 抽出物をエバポレーターで乾固した。13 i.d.x 5 mm の silica gel カラムを作成し少量の CHCl_3 で溶かした EtOAc 抽出物を吸着させた。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/0, 100/1, 100/3, 100/5, 9/1, 1/1, 0/100$ で 1 mL ずつ段階的に溶出した。評価する量 (20 μ L) のサンプルを 1.5 mL マイクロチューブに分注しサーバントで濃縮し評価用サンプルとし、4-3-2 と同様希釈したサンプルを用いて抗菌活性評価を行った。50 μ L を LC/UV バイアルのインサートに入れデシケーターで乾固した。乾固した LC/UV バイアルに 200 μ L の MeOH で再溶解し LC/MS 分析をした。

・ 条件検討結果

Sep-Pak で分画した分画物では 30% CH_3CN 画分に抗 *F. psychrophilum* 活性を確認した。EtOAc 抽出では水層に抗 *F. psychrophilum* 活性を確認した。silica gel カラムで分画した分画物では EtOAc 抽出で水層に抗菌活性抗 *F. psychrophilum* 活性を確認できなかった。

総括

微生物は、同じ環境中で拮抗する他の微生物に対して抗菌活性を持つ化合物を生産すると考えられている。また、生物と共生する微生物が宿主の身を守るような抗菌物質を生産したという報告がある[5]。植物にとって微生物は病原菌として植物に悪影響を及ぼす場合がある。一方で土壌からの栄養吸収の補助や、菌根の形成、病原菌である微生物に対する抗生物質を生産する[19]など様々な役割を持つ。また微生物にとっても植物は宿主であり、植物ホルモンなどの様々な影響を受ける。特に葉の表面や根圏では植物と微生物は相互作用しながら、共生関係を築いている[19]。植物の葉や根圏などから分離した植物由来微生物を用いて植物病原菌や害虫に対する創薬研究が行われている[20]。以上のことを踏まえ、本研究では水中に根を張る水生植物の根圏付近では *F. psychrophilum* から宿主、または自身を守るために抗菌物質を生産していると考えた。1章である水生植物を用いた分離において、本研究では植物内生菌だけでなく水中に存在する根や葉の表在菌も分離ターゲットとしている為、一般的に植物由来微生物の分離工程である表面殺菌を行っていない。表面殺菌とは植物の葉や根の表面を次亜塩素酸ナトリウムや70%エタノールなどを用いて表面に付着または生息している微生物を殺菌、排除することにより、植物内生菌の選択的分離を可能とする方法である[21]。空气中に存在する菌類は分離培地上での生育が早い。その為、表面殺菌を行わない事により分離プレート上を空气中の菌や表在菌に覆われてしまい、内生菌を分離することが出来なくなる事が懸念されたが、そのような分離プレートは見られなかった。これは植物が水中に存在していた事に起因すると考えた。本研究では水生植物から真菌類を分離を行なった結果、陸上植物から普遍的に分離される菌類が多く採集された。水生植物からの真菌類分離の報告は土壌や植物と比べ少ない。その為、水生植物特有の真菌類や菌叢を確認する事は出来なかった。当研究所では水生植物のサンプリングは例に無い。その為、多摩川流域における水生植物に関する論文を元に採集を行なった[22]。上流は流れが早く採集は不可能であった。その為、岸辺に生えていた藻類を採集したが2種類のみとなった。また、淡水域におけるサンプリングは季節や時期が大きく関係する。気温や水量に加え、水生植物が豊富な用水路では農業の時期に合わせた人工的な取水、放水により、環境が大きく変わる為である。実際に著者がサンプリングに向かった府中市の一部の用水路は水門により川からの水が断たれ干上がっていた。

Flavobacterium psychrophilum は難培養性である。その為、著者は評価系において効率的な培養培地を模索してきた。論文[17]より引用し FLPA 培地を作成して *F. psychrophilum* の培養を行なった。本研究においても FLPA

液体培地で良好に培養できたが、改善の余地は多い。*F. psychrophilum* 培養培地開発の論文[23]では牛の血清を用いた培地を作成している。効率的かつ正確な活性評価の為に更なる培地検討が必要である。スクリーニングでは構築した評価系を用いて *F. psychrophilum* に対して水生植物由来微生物培養抽出物 280 サンプルを評価した結果、21 サンプルが通過した。当研究所では約 1~3%のスクリーニング通過率を本研究では 7.5%と非常に高い結果を示した。今後の発展として化合物の単離、精製、in vivo 試験がある。水生植物由来真菌類である FKI-10310 株は条件検討の結果から EtOAc 抽出物では水層 ODS 分画物では 30%に抗 *F. psychrophilum* 活性がある事が分かった。本研究では *F. psychrophilum* の培養状態悪化により、筆者が活性物質を単離することができなかつた為、今後の研究に期待したい。また、*F. psychrophilum* の in vivo 試験ではニジマスの稚魚を用いる事を想定している。魚類の実験に一般的に用いられるゼブラフィッシュでは *F. psychrophilum* を感染させるのに遺伝子操作が必要である[24]。地方水産試験場などで in vivo 活性試験が行われていることから、当研究所においても生体への感染実験等を行い評価系の構築、in vivo 活性試験へと発展させることができると考えている。世界の人口増加に伴い漁業の需要は増加している、その為、漁獲量も増加しており、持続可能な漁業資源は減少している。生物学的に持続可能な水準内にある魚類資源の割合は 1990 年では 90%であったのに対し 2017 年では 65.8%まで減少している[24]。また、環境汚染や地球温暖化などによる水産資源への影響を考慮すると水産資源の保全は世界の急務である。需要の増加に伴い養殖による生産高は増加している。水産資源の枯渇を防ぐとともに需要に対する供給を行う為に養殖による魚類生産高は今後も増加していくと考えている。その為、養殖業に多大な損失を与える魚類感染症の対策を強化していく必要がある。冷水病は北米の魚類感染症でありヨーロッパや韓国 [25]、オーストラリア、チリなどにおいても感染が確認されている。その為、冷水病医薬品の市場は日本だけに留まらず世界の養殖業にあると考えている。また今後の予定としてスクリーニングを通過した 21 サンプルの精製条件の検討および大量培養を行い *F. psychrophilum* に対する抗菌活性物質の単離、構造決定を行う。

本研究結果から水中に根を張る水生植物の根圏や植物体内に存在する真菌類は自然界で *F. psychrophilum* と接していることから宿主、または自身を守るために *F. psychrophilum* に対する抗菌物質を生産していることが示唆された。環境中にある病原微生物に対する抗菌物質を探索する際には本研究と同様の手法を用いることで効率的に目的の病原微生物に対する抗菌物質を探索することが出来ると筆者は推察した。

参考文献

1. 水産庁. (2016). 水産白書
https://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h28_h/trend/1/t1_1_1_2.html
2. 石川 武彦., (2014). 内水面漁業の現状と課題. 立法と調査 No.357
3. 妹尾秀實., (1935). 水産界の恩人石川博士を憶ふ. 動物學雜誌第四十七卷第五百六十二・三號 故石川千代松博士記念號
4. 農林水産省. (2008). アユ冷水病対策協議会取りまとめ
5. 東京都島しょ農林水産総合センター. (2000). 多摩川における放流アユの不漁原因と冷水病の関係
<https://www.ifarc.metro.tokyo.lg.jp/archive/26,331,52,209.html>
6. 栃木水産試験場
<https://www.pref.tochigi.lg.jp/g65/ayubyoukizyouhou.html>
7. Rocco C. Cipriano. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet* No. 86
8. Kumagai, A. (2016). Bacterial Cold-water Disease in Salmond Fish and Ayu. *Fish Pathology*, 51,153–157.
9. Fleming, A. (1929). On the Antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with Special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Archive of British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226-236
10. Kenichi, N. (2013). *Virgaria boninensis*, a new hyphomycete (Xylariaceae) from soils in the Bonin Islands, Japan. *Mycoscience*, 54,394-399
11. Jarrod, J. Scott., et al. (2008). Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *SCIENCE*, 322,63

12. Kenichi, N. (2013). Five new *Simplicillium* species (Cordycipitaceae) from soils in Tokyo, Japan. *Mycoscience*, 54,42-53
13. BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
14. Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org>
15. MycoBank <https://www.mycobank.org>
16. 菅原和宏. 江口 充., (2010). アユ冷水病 に対する加温処理の治療効果. クロマグロ等の養殖科学の国際教育研究拠点グローバル COE プログラム 2008~2009 (平成 20~21) 年度中間成果報告書, 331-335
17. Catalina, C., Sonia, et al. (2004). Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture*, 238,75-82
18. Christopher, D. Powell., et al. (2020). New Insights into Modelling Bacterial Growth with Reference to the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Animals*, 435
19. 畑 邦彦., et al..(2008). マツ死葉における表面殺菌法の検討
九州森林研究 No.61
20. Ranit Carmi, Shmuel Carmeli,(1994). (+)-(S)-DIHYDROAERUGINOIC ACID, AN INHIBITOR OF SEPTORIA TRITICI AND OTHER PHYTOPATHOGENIC FUNGI AND BACTERIA, PRODUCED BY *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*. *Journal of Natural Products* Vol. 57, No. 9, pp. 1200-1205,
21. 鈴木 晴美., et al.(2014). 多摩川扇状地の農業水路における水生植物の分布. *Vegetatio Science* 31: 95-103
22. 中津川 俊雄., et al..(2006). *Flavobacterium psychrophilum* のための新しい分離用培地. 京都府立海洋センター研究報告 28号, p.33-37

23. Ruben Avendano-Herrera.,et al.(2020). Zebrafish as an animal model for bath infection by *Flavobacterium psychrophilum*.*Journal of fish diseases*
24. FAO <https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/en/>
25. 李圭範, et al..(1998). First Isolation and Identification of *Cytophaga psychrophila* from Cultured Ayu in Korea *Fish Pathology*.33.p. 37-38

実験材料・機材・培地組成

【培地組成】

《真菌類分離用培地》

ジャガイモ・ブドウ糖寒天培地 (Potato Dextrose Agar, PDA)

Difco™ Potato dextrose agar	Becton Dickinson®	3.9%
Diluted Water (D. W.)		

《抗生物質添加 PDA》

Difco™ Potato dextrose agar	Becton Dickinson®	3.9%
Kanamycin	富士フィルム和光純薬 (株)	100 mg/mL
Chloramphenicol	関東化学 (株)	100 mg/mL
D. W.		

《抗生物質添加カゴメ野菜ジュース寒天培地》

カゴメ野菜ジュース	カゴメ (株)	200 mL
CaCO ₃	関東化学 (株)	0.3%
Agar	関東化学 (株)	2%
Rose Bengal	富士フィルム和光純薬 (株)	50 mg/mL
Kanamycin	富士フィルム和光純薬 (株)	100 mg/mL
Chloramphenicol	関東化学 (株)	100 mg/mL
D. W.		

《抗生物質添加 Onion Garlic Agar》

すりおろしにんにく		2%
すりおろしたマネギ		2%
Agar	関東化学 (株)	2%
Rose Bengal	富士フィルム和光純薬 (株)	50 mg/mL
Kanamycin	富士フィルム和光純薬 (株)	100 mg/mL
Chloramphenicol	関東化学 (株)	100 mg/mL
D. W.		

《保存用斜面培地》

改変三浦培地 (LCA)

NaNO ₃	関東化学 (株)	0.2%
Yeast extract	オリエンタル酵母 (株)	0.02%
Glycerol	関東化学 (株)	0.1%
KH ₂ PO ₄	関東化学 (株)	0.08%
K ₂ HPO ₄	関東化学 (株)	0.02%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	富士フィルム和光純薬 (株)	0.02%
KCl	関東化学 (株)	0.02%
Agar	関東化学 (株)	2.0%
D.W.		
pH 6.0		

Emerson 培地 (YpSs)

Soluble Starch	関東化学 (株)	1.5%
Yeast extract	オリエンタル酵母 (株)	0.4%
K ₂ HPO ₄	関東化学 (株)	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	富士フィルム和光純薬 (株)	0.05%
Agar	関東化学 (株)	2.0%
D.W.		

《種培養用培地》

GP 培地

Glucose	富士フィルム和光純薬 (株)	2.0%
Yeast extract	オリエンタル酵母 (株)	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	富士フィルム和光純薬 (株)	0.05%
Hipolypeptone	富士フィルム和光純薬 (株)	0.5%
KH ₂ PO ₄	関東化学 (株)	0.1%
Agar	関東化学 (株)	0.1%
Tap Water (T.W.)		
pH 6.0		

《化合物生産用液体培地》

F8 培地

Soluble starch	富士フイルム和光純薬 (株)	3.0%
Glycerol	富士フイルム和光純薬 (株)	1.0%
山吹色きな粉	東京保存食量 (株)	2.0%
Dry Yeast	日仏商事 (株)	0.3%
KCL	関東化学 (株)	0.3%
CaCO ³	関東化学 (株)	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	関東化学 (株)	0.05%
KH ₂ PO ₄	関東化学 (株)	0.05%
キナ酸		
蒸留水		

F8QA 培地

Soluble starch	富士フイルム和光純薬 (株)	3.0%
Glycerol	富士フイルム和光純薬 (株)	1.0%
山吹色きな粉	東京保存食量 (株)	2.0%
Dry Yeast	日仏商事 (株)	0.3%
KCL	関東化学 (株)	0.3%
CaCO ³	関東化学 (株)	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	関東化学 (株)	0.05%
KH ₂ PO ₄	関東化学 (株)	0.05%
蒸留水		

※湿熱滅菌した F8 培地に、濾過滅菌後の Quinic acid 溶液 1 % を添加した。

F38

Soluble starch	富士フイルム和光純薬 (株)	3.0%
Sucrose	富士フイルム和光純薬 (株)	3.0%
Malt extract	Difco™	1.0%
Ebios	アサヒグループ食品 (株)	0.3%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	関東化学	0.05%
KH ₂ PO ₄	関東化学	0.05%
蒸留水		

F36

ハナマサ米

5g

昆布茶

伊藤園 (株)

0.5 mL

【化合物単離・構造解析用試薬】

アセトニトリル：特級

関東化学 (株)

アセトン：EP

関東化学 (株)

無水硫酸ナトリウム

富士フイルム和光純薬 (株)

メタノール：鹿一級

関東化学 (株)

メタノール：HPLC 用

関東化学 (株)

酢酸エチル：鹿一級

関東化学 (株)

ヘキサン：鹿一級

関東化学 (株)

塩酸

富士フイルム和光純薬 (株)

TFA：鹿一級

関東化学 (株)

DMSO- d_6

関東化学 (株)

CD₃OD

関東化学 (株)

CDCl₃

関東化学 (株)

【DNA 解析用試薬】

PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent	Applied Biosystems™
QIAGEN®□ Fast Cycling PCR Kit	QIAGEN
DNase-RNase Free Water	
Fast PCR Master Mix	
Primer (100 pM)	Invitrogen™
ITS 領域→ITS2, ITS3, ITS4, ITS5	
LSU 領域→LR0R, LR5, LR7	
QIAquick®□ PCR Purification Kit	QIAGEN
Buffer EB Elution buffer	
Buffer PB Binding buffer	
Buffer PE Wash buffer	
エタノール : 特級	関東化学 (株)
BigDye®□ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	
5 × Sequencing Buffer	
BigDye XTerminator™ Purification Kit	Applied Biosystems™
XTerminator™ Solution	
SAM™ Solution	
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen™
10 × BlueJuice™ Gel Loading Buffer	Invitrogen™
Agarose for ≥1kbp fragment	ナカライテスク (株)
SYBR® Green	Lonza
TAE (トリス-酢酸-EDTA 緩衝溶液 pH8.3)	ナカライテスク (株)
KOD	
DNeasy®□ Plant Mini Kit	QIAGEN
Buffer AE Elution Buffer	
Buffer AP1 Lysis Buffer	
Buffer P3 Neutralization Buffer	
Buffer AW1 Wash Buffer	

【使用機材】

《微生物学的実験操作に用いた機材》

コンラージ棒	日水製薬（株）
マイクロピペット	
PIPETMAN p シリーズ	GILSON
Eppendorf Research	Eppendorf
Eppendorf Reference	Eppendorf
ピペットチップ	
ピタラック滅菌フィルターチップ	SARSTEDT
竹串	
やなぎ印 武丸引印	やなぎプロダクツ
パラフィルム	
4 IN.x125FT. PARAFILM M Barieer Film	Bemis Flexible Packaging
Labopita	AGLIS
ターンテーブル	日本理化学機器（株）
電子天秤：EK-3000j, ER-182A	A&D Company
白金線	Argos Technologies In
分注器 10 cc	（株）ヒラサワ
クリーンベンチ	
S-1300PBY	昭和化学（株）
BGB-1300S	三英製作所（株）
高圧蒸気滅菌装置：LSX-300, 500	トミー精工（株）
恒温槽：SM-05N	タイテック（株）
キムワイプ	日本製紙クレシア（株）
キムタオル	日本製紙クレシア（株）
アルミ箔	日本製箔（株）
ラップフィルム：サランラップ	旭化成ホームプロダクツ（株）
滅菌シャーレ 60 mm , 90 mm×15 mm	関東化学（株）
スパチュラー	サンダイア
ネジロ試験管	IWAKI
ボルテックスミキサー：AUTOMATIC MIXER S-100	タイテック（株）
卓上小型遠心機	
Smart 13	Hanil
D1008	BIOLOGIX

遠心機

MX-205	トミー精工 (株)
CF7D2	日立工機 (株)
冷蔵庫 : MPR-414FRS-PJ, MPR-721-PJ	PHC (株)
インキュベーター : MIR-554-PJ	PHC (株)
乾熱滅菌器 : Drying Sterrilizer SG810	ヤマト科学 (株)
すり鉢	

《DNA 解析に用いた機材》

DNA シーケンサー : 3130 DNA Analyzers	Applied Biosystems
DNA 抽出用カラム : QIAQuick®Spin Columns	QIAGEN
96 well プレート : Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
96 well プレート (蓋) : Plate Septa 96-well	Applied Biosystems
96 well プレートシール : Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
サーマルサイクラー : Veriti	Applied Biosystems
キャップロック : マルチリッドロック	日本ジェネティクス (株)
ゲル撮影装置 : Mupid Scope WD	ADVANCE
電気泳動槽 : Mupid-exu	ADVANCE
塩基配列情報解析ソフト : Laseergene 17.1.1	DNASTAR®

《活性評価系構築に用いた機材》

マイクロプレートリーダー

丸底 96 well Plate

デンストメーター ($\lambda=565\pm 15\text{nm}$)

プレート用シール (Breathable Type)

ボルテックスミキサー : AUTOMATIC MIXER S-100 タイテック (株)

大試験管

マイクロピペット

PIPETMAN p シリーズ

GILSON

Eppendorf Research

Eppendorf

Eppendorf Reference

Eppendorf

ピペットチップ

ピタラック滅菌フィルターチップ

SARSTEDT

クリーンベンチ

S-1300PBY

昭和化学 (株)

BGB-1300S

三英製作所 (株)

インキュベーター

滅菌シャーレ 60 mm , 90 mm×15 mm

関東化学 (株)

白金線

Argos Technologies In

パラフィルム

冷蔵庫 : MPR-414FRS-PJ, MPR-721-PJ

PHC (株)

恒温槽 : SM-05N

タイテック (株)

アルミ箱

日本製箔 (株)

《化合物単離・構造解析に用いた機材》

LC/ESI-MS

LC : Exion LC

AB Sciex

MS : Triple TOF 5600

AB Sciex

カラム : CAPCELL core (3.0 i.d. × 100 mm)

OSAKA SODA

LC/UV : 1200 infinity series

Agilent Technologies

カラム : Symmetry C18 (2.1 × 150 mm)

Waters

浸とう装置 (大試験管用)

いわしやバイオサイエンス

浸とう培養器 (三角フラスコ用)

高崎化学機械

エバポレーター

ロータリー部 : N-1300

東京理科器械

ポンプ部 : NVP-2000

東京理科器械

湯浴 : SB-1300

東京理科器械

冷却器 : CA-1116A

東京理科器械

コントローラー : NVC

東京理科器械

遠心エバポレーター : SAVANT SPD2010

Thermo Scientific

遠心機 : KUBOTA 8100

久保田製作所

Dictionary of Natural Products on DVD (ver. 29.2)

CRC press

Silica gel 樹脂 : Silica gel 60 F254

Merck KGaA

多摩川流域に生息する水生植物から分離した糸状菌を用いた抗冷水病活性物質
の探索

(研究助成・学術研究 VOL. 51- NO. 369)

著 者 酒井 一成

学校法人北里研究所 大村智記念研究所

微生物応用化学研究室 特別研究員 (採択当時)

発行日 2022年10月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>