平成９年度産業技術研究開発事業

新エネルギー・産業技術総合開発機構委託

複合生物系等生物資源利用技術開発
（生物利用石油代替燃料製造技術の開発）
成果報告書

平成10年３月

財団法人 バイオインダストリー協会

NEDO 図書・資料室
010013818-9

平成９年度産業技術研究開発事業

新エネルギー・産業技術総合開発機構委託

複合生物系等生物資源利用技術開発
（生物利用石油代替燃料製造技術の開発）
成果報告書

平成10年３月

財団法人 バイオインダストリー協会

目　次

まえがき …… 1

第1章　成果の概要 …… 3
平成9年度成果の概要 …… 5
Overview of the results achieved in fiscal 1997 …… 7
研究担当者 …… 9

第2章　木質等未利用資源の利用技術（未利用資源の利用技術）……11
①木質・構成成分等の高度利用技術 ……13
1.　緒　　言 ……13
2.　実験装置および方法 ……15
2.1　シロアリおよびカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術 ……15
2.1.1　シロアリ消化管内の微生物複合系の解析 ……15
2.1.2　シロアリの木材分解酵素および関連酵素系について ……17
2.1.3　シロアリ消化管内細菌の培養について ……18
2.2　木質分解複合微生物系の構築と複合ベクターの開発技術 ……19
2.2.1　リグニン分解複合系の構築と探索 ……19
2.2.2　白色腐朽菌の木材分解に関与する酵素系の探索 ……19
2.2.3　木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術 ……20
2.3　リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術 ……21
2.3.1　ラッカーゼのメディエーターの探索技術 ……21
2.4　微生物相互作用による分化制御因子の利用技術 ……21
2.4.1　エノキタケ、ヒラタケなど担子菌類の子実体形成に
およぼす他の微生物の影響 ……21
2.5　植物共生微生物の利用技術 ……22
2.5.1　爪楊枝とろ紙で捕捉したつくば産の土壌糸状菌とその菌相 ……22
2.5.2　シロアリとシロアリが生息環境から分離される糸状菌 ……22
3.　結果及び考察 ……23
3.1　シロアリおよびカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術 ……23
3.1.1　シロアリ消化管内の微生物複合系の解析 ……23
3.1.2　シロアリの木材分解酵素および関連酵素系について ……24
3.1.3　シロアリ消化管内細菌の培養について ……25
3.2　木質分解複合微生物系の構築と複合ベクターの開発技術 ……26
3.2.1　リグニン分解複合系の構築と探索 ……26
3.2.2　白色腐朽菌の木材分解に関与する酵素系の探索 ……26

3.2.3　木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術 ……26
3.3　リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術 ……27
3.3.1　ラッカーゼのメディエーターの探索技術 ……27
3.4　微生物相互作用による分化制御因子の利用技術 ……27
3.4.1　エノキタケ、ヒラタケなど担子菌類の子実体形成に
およぼす他の微生物の影響 ……27
3.5　植物共生微生物の利用技術 ……27
3.5.1　爪楊枝とろ紙で捕捉したつくば産の土壌糸状菌とその菌相 ……27
3.5.2　シロアリとシロアリが生息環境から分離される糸状菌 ……28
4.　結　　語 ……28
5.　参 考 文 献 ……32

［再委託研究］……64
1.　シロアリなどの食材性昆虫の体内微生物研究 ……64
（東京大学教養学部　松本忠夫教授）
2.　リグニン分解過程の高度解析のための基質開発と
それを用いた複合生物機能の解析 ……70
（東京農工大学大学院　片山義博助教授）

第３章　石油代替有用資源生産技術（微生物・植物複合系の利用技術）……85
①熱帯油糧植物の高度利用技術 ……87
1.　緒　　言 ……87
2.　実験装置および方法 ……88
2.1　微生物－植物複合系による熱帯油糧作物の組織培養・大量増殖技術 ……88
2.1.1　アブラヤシ組織の準備と調製 ……88
2.1.2　アブラヤシ組織からのカルス誘導 ……90
2.1.3　アブラヤシカルスからの植物体再分化 ……91
2.2　微生物－植物複合系を用いた熱帯油糧作物の形質転換技術 ……91
2.2.1　アブラヤシ形質転換の予備的実験 ……91
2.2.2　形質転換ベクターの構築 ……92
2.3　熱帯油糧植物からの有用遺伝子単離 ……93
2.3.1　植 物 材 料 ……93
2.3.2　cDNA ライブラリーの作製 ……93
2.3.3　ユビキチン cDNA の単離 ……93
2.3.4　ディファレンシャルスクリーニング ……94
2.4　熱帯植物－微生物コンソーシアにおける相互作用の分子生物学的解明 ……94
2.4.1　*Ganoderuma* の観察と採集 ……94
2.4.2　*Ganoderuma* の培養 ……95

3. 結果および考察 ……95
3.1 微生物－植物複合系による熱帯油糧作物の組織培養・大量増殖技術 ……95
3.1.1 アブラヤシ組織の準備と調製 ……95
3.1.2 アブラヤシ組織からのカルス誘導 ……96
3.1.3 アブラヤシカルスからの植物体再分化 ……97
3.2 微生物－植物複合系を用いた熱帯油糧作物の形質転換技術 ……98
3.2.1 アブラヤシ形質転換の予備的実験 ……98
3.2.2 形質転換ベクターの構築 ……98
3.3 熱帯油糧植物からの有用遺伝子単離 ……99
3.3.1 cDNA ライブラリーの作製 ……99
3.3.2 ユビキチン cDNA の単離 ……99
3.3.3 中果皮特異的に発現する cDNA の単離 ……100
3.4 熱帯植物－微生物コンソーシアにおける相互作用の分子生物学的解明 ……101
3.4.1 *Ganoderuma* の観察と同定 ……101
4. 結　　語 ……102
5. 参 考 文 献 ……104

［再委託研究］ ……143
1. Establishment of Transformation System in Oil Palm ……143
(Agency for the Assessment and Application of Technology (BPPT), Indonesia)
2. Optimizing Conditions for Callus Induction from Oil Palm Younger Leaf ……149
(Bakrie and Brothers, Indonesia)

第4章 総合調査研究 ……155
① 研 究 支 援 ……157
② 再委託研究 ……167
Lichens of Brazil: Cerrado(Savanna)Region
Institute Butantan, Brazil

第5章 社外成果発表状況 ……245

まえがき

複合生物系による物質分解および物質生産等の機能利用技術として、複合生物系のハンドリング技術開発を行うとともに、複合生物系を利用して有用物質を生産する技術を開発することを目標に研究を実施する。平成９年度は、複合生物系の機能利用技術についての基礎となる要素技術開発の検討を下記の研究項目で実施した。

1. 木質等未利用資源の利用技術
2. 石油代替有用資源生産技術
3. 総合調査研究

第１章　成果の概要

平成９年度成果の概要

1. 木質等未利用資源の利用技術（未利用資源の利用技術）

① 木質・構成成分等の高度利用技術

- シロアリ及びカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術については、各種シロアリをリグニンモデル化合物であるウンベリフェロンエーテル含有の濾紙で飼育し、オオシロアリ等数種のシロアリが β-O-4 エーテル結合を切断することを明らかにした。シロアリに共生する腸内細菌を培養して、上述の活性が嫌気よりも好気培養、25℃よりも 37℃ 培養でより強いことを確認した。培地にルーメン液を添加することにより活性が大きく上昇した。
- 木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術については、合成リグニン（DHP）の分解によるフィルターからの溶出を指標とする複合作用を示す菌株の組み合わせのスクリーニング系を構築した。遺伝子による複合作用を調べるためのリグニン分解遺伝子を取得した。
- リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術については、ベラトリルアルコールの酸化を指標としたラッカーゼメディエーターのスクリーニング系を構築し、数種のカビがメディエーターを産生することを明らかにした。
- 微生物間相互作用による分化制御因子の利用技術については、ヒラタケ、エノキタケを用いて複合作用を調べるスクリーニング系を検討した。
- 植物共生微生物の利用技術については、腐朽材からの菌分離をカビを中心に行った。

2. 石油代替有用資源生産技術（微生物・動植物複合系の利用技術）

① 熱帯油糧植物の高度利用技術

- アブラヤシ（*Elaeis guineensis* Jacq.）の組織からカルスを誘導する条件を設定した。すなわち、5～16 年生のアブラヤシを用いて、生長点からわずかに上部の未展開葉を培養することで、20～50％ の頻度でカルスを誘導することに成功した。
- アグロバクテリウムの感染力を利用したアブラヤシの形質転換系を確立するために、レポーター遺伝子（β-Glucuronidase）と選択マーカー遺伝子（ハイグロマイシン耐性）を組み込んだ発現ベクターを構築した。
- アブラヤシ果肉組織から mRNA を単離し、cDNA ライブラリーを作成した。強力なプロモーターの単離を目的として、細胞内で高発現しているユビキチンの部分塩基配列を決定した。
- アブラヤシの重要病原菌である *Ganoderma* をインドネシアのアブラヤシ農園から採取し、形態的観察による同定を試みた。その結果、本菌は *Ganoderma boninense* の一種であると推定された。

3. 総合調査研究

- 集中研究の実施場所である生命工学工業技術研究所における研究の進捗を管理・促進するために「所内研究進捗検討会」を毎月1回開催し、各研究テーマの進捗状況について発表・討議を行った。また、「研究推進委員会」を隔月開催し、研究推進に必要な施策について協議・検討を実施した。
- 生物利用石油代替燃料製造技術の開発研究を促進・効率化を図るため、ブラジルのサンパウロ州立ブタンタン研究所に再委託研究「Lichens of Brazil : Cerrado (Savanna) Region」を実施し基盤研究により支援した。

Overview of the results achieved in fiscal 1997

1. Utilization technology for unused natural resouces including wood
   (Utilization technology for unused natural resouces)

① Intensive utilization technology for woods and their components

- For utilization technology of the symbiotic microorganisms in the digestion guts of the termites, cerambycids, and other wood-eating insects, various genera of termites were raised on the filter paper soaked with lignin model compound, i.e., umbelliferone ether. The β-O-4 ether linkage appeared to be cleaved by the termites including Hodotermopsis sp.. The bacteria cultivated from the termite guts showed stronger activity aerobically than unaerobically. They were also more active at 37℃ than at 25℃. Such activity apparently increased in culture by bovine rumen fluid added.
- To construct technically the wood-decaying bioconsortia and develope the vector system among interrelated microorganisms, a new screening system was constructed to find the combination of strains indicating interrelated action as the index marker by measuring the dissolved amount of the synthetic lignin from the filter paper as breakdown products. The lignin-degradating enzyme genes were acquired to study interrelated actions among genes.
- For the screening of the lignin-degradating enzyme mediators and their utilization, a screening system for the laccase mediator was constructed as the index marker of the oxidation of veratryl alcohol. Several fungi were selected as the mediator producing strains.
- To utilize technically the differentiation control factors mediated with the actions among microorganisms, a screening system for interrelated actions was studied using basidiomycetous fungi including Pleurotus ostreatus and Flammulina velutipes.
- For utilization technology of plant-associated microorganisms, fungi were mainly isolated from the decayed woods for above purposes.

2. Technology to manufacture a useful resouces in place of mineral oil
   (Utilization technology for microbes, fauna and flora of complex systems)

① Intensive utilization technology for tropical oil crops

- The conditions of callus induction from oil palm tissues were carefully studied. Using 5 to 16 years -- old palm trees, the younger leaf tissues (unexpanded leaf) isolated from upper parts of meristem were cultured in

the MS-based medium. Callus was appeared from this tissue at the frequency of 20 to 50%.

- To establish the Agrobacterium-mediated transformation system of oil palm, the expression vector harboring the reporter gene (β-Glucuronidase from E. coli) and selectable marker gene (hygromycin resistance) was constructed. The vector was introduced into a binary vector EHA 101.
- The cDNA bank was constructed from mRNA of palm mesocarp tissue. To screen the strong promoter, the ubiquitin gene was isolated and the partial sequences were determined.
- One of the most important pathogens for oil palm, some *Ganoderma* strains were isolated from palm plantation in North Sumatra. Microscopic observation indicated that the Ganoderma strains isolated belonged to *Ganoderma boninense*.

3. Research study for the project

- In order to manage and promote the progress of research at the National Institute of Bioscience and Human-Technology, where the centralized management of this research is carried out, meetings are held once a month to examine the progress of research at the institute, and reports made and discussion held on how each research item is progressinng. Additionally, meeting of the comittee to promote research are held every other month to think about and examine measures required for promoting the research.
- So as to promote and improve efficiency in the deveropment and technology research to manufacture a useful resources in place of mineral oil, research was re-entrusted to Sao Paulo State Institute Butantan, Brazil [Lichens of Brazil: Cerrado (Savanna) Region] and basic research was furnished in support of this project.

研究担当者

氏名	所属	研究項目
渡辺恒雄	(財)バイオインダストリー協会　生物資源総合研究所　研究員	木質等未利用資源の利用技術
北出理	〃	
広末慎嗣	〃	
渡辺東	〃	
金戸玲	〃	
土橋和之	〃	
渡辺吉雄	〃	
河村直人	〃	
坂田紀秋	〃	
鮫島明宏	〃	
有徳保秀	〃	
上松仁	〃	
有沢章	〃	
藤井匡	〃	
平井浩文	〃	
山本純子	〃	
中川明子	〃	
片山義博	東京農工大学大学院生物システム応用科学研究科　助教授	再委託研究
松本忠夫	東京大学　教養学部　教授	
大岸治行	(財)バイオインダストリー協会　生物資源総合研究所　研究員	石油代替有用資源生産技術
田中章	〃	
佐野浩	〃	
村瀬誠	〃	
小笠原健	〃	
濱野章子	〃	
三川隆	〃	
杉山真人	〃	
田口康之	〃	
Dr.Irawadi Jamaran	BPPT, Senior Researcher	再委託研究
Dr.Nadirman Haska	BPPT, Senior Researcher	
Dr.Witono Basuki	BPPT, Assistant Senior Researcher	
Dr.Agus Maeduki	BPPT, Assistant Senior Researcher	
Dr.Kusnandar	BPPT, Assistant Senior Researcher	
Wahyu Purbowasito	BPPT, Junior Researcher	
Teuku Tajuddin	BPPT, Junior Researcher	
Linda Novita	BPPT, Assistant Researcher	
Dr.Untung Muradiyatmo	Bakrie&Brothers, Senior Researcher	
Dr.J.S.Tahardi	Bakrie&Brothers, Senior Researcher	
Refi Enggriany	Bakrie&Brothers, Junior Researcher	
Herliany Sylvia	Bakrie&Brothers, Junior Researcher	

氏　　名	所　　属	研究項目
後藤暎二	(財)バイオインダストリー協会　生物資源総合研究所　研究員	総合調査研究
高山義博	〃	
依田次平	〃	
中村哲夫	〃	
小林　靖		
山川紀子	〃	
佐々義子	〃	
村山仁美	〃	
長島由果	〃	
坂本理奈	〃	
植村　薫	〃	
テツオ　ヤマネ	ブータンタン研究所　顧問	再委託研究

第２章　木質等未利用資源の利用技術
（未利用資源の利用技術）

①木質・構成成分等の高度利用技術

1. 緒　　言

近年、地球環境とエネルギーの関係が大きな問題となっている。そのような問題の一つに化石燃料などのエネルギー源の枯渇があり、代替エネルギーを作り出す努力がなされている。化石燃料に代わる枯渇しないエネルギー源としては、現在ほとんど利用されてはいないバイオマス（植物などの生物）資源が注目されている。産業廃棄物あるいは農作物からエネルギー（液体あるいは気体燃料）を取り出すためのエネルギー変換システムとして、省エネルギーで環境を汚染しない無公害のバイオ技術が注目されている。例えば、木材とその樹脂やもみがらなどの残余物からメタノールを合成抽出したり、サトウキビや木材繊維等を発酵させてエタノールを生成する方法等が開発されつつある。

しかし、バイオマス資源を使用するには、次のような問題点がある。植物は大部分がセルロースとリグニンで構成されている。リグニンは植物中に18〜30%も含まれ木質化に重要な役割を果たしている。リグニンはセルロース繊維またはヘミセルロース繊維を架橋することで非常に堅牢な高分子ポリマー繊維を形成し、植物は木質化する。この部分は非常に分解しにくいため、木材などの処理が難しく、その利用が阻まれている原因となっている。

シロアリ・食材性ゴキブリ・カミキリムシ・クワガタムシ等の食材性昆虫には消化管中に特異的な微生物群集を保有するものが多いことがよく知られている。とくに熱帯域を中心に非常に大きな現存量をもち、生態的に極めて重要な位置を占めるシロアリ類では、後腸内に 多種の原生動物、真正細菌、古細菌などからなる微生物群集を保有する。シロアリの微生物群集は、セルロース・リグニンを中心とする木質の分解を通じて宿主シロアリのエネルギー獲得に主要な役割を果たす多くの原生動物とともに、宿主の物質代謝においても極めて重要な役割を担う窒素固定・尿酸分解・メタン産生などの代謝系をもつ各種細菌を含む。これらの微生物は複数の種が互いに協同して物質代謝系に関与していると考えられ、換言すれば宿主体内で特異な微生物複合系を構成しているといえるであろう。

このような食材性昆虫の消化管内微生物は、特にリグニン等の木質分解への工業的利用や、構造の類似した難分解性有害化合物の分解への応用など、産業的利用価値が大いに見込まれる。しかしながら現在までのところ、どのような微生物がシロアリ等の消化管内に生息しているのか、また各種微生物間の関係がどのようなものであるのか、という点については十分な知見がない。このことが多くの構成種が嫌気性で分離・培養が困難であることと併せて、産業利用を妨げる一つの大きな要因となっている。

シロアリについては、セルロース分解についての研究は行われているものの、リグニン分解については一部報告があるのみであり[1]、そのメカニズムまでは解明されていない。とくにシロアリの場合白色腐朽菌と異なり、腸内で分解しているので、白色腐朽菌のように酸化的に分解していることが考え難く、産業上利用可能な分解機構を有していることが予想される。

近年のリグニン生分解分野における研究の進展は著しいものがあり、微生物のリグニン分解能をパルプ化や漂白、木質系資源の粗飼料化や微生物蛋白への変換、リグニンの有用

物質への変換、およびパルプ廃液の浄化などに活用して、新しい省力型、無公害型のプロセスを開発することに多くの関心が寄せられるようになった[2)3)4)]。

木材に侵入し、その成分を分解して栄養源とする微生物としては、細菌、放線菌、接合菌、子嚢菌、担子菌、不完全菌などが挙げられる。これらのうちで、リグニン分解に重要な役割を演じているのは、担子菌の白色腐朽菌である。細菌類（*Pseudomonas*）、放線菌類（*Streptomyces*）、不完全菌類（*Candida, Cephalosporium, Fusarium, Trichosporon*）、子嚢菌類（*Chaetomium*）などもリグニン分解能をもつが、木材中に存在するリグニンを分解できるのは白色腐朽菌のみである。しかし、天然界でのリグニンの生分解には、複数の微生物が関与していることは明らかである[2)3)4)]。

白色腐朽菌である *Phanerochaete sordida* YK-624 株は極めて優れたリグニン分解能を示し、広葉樹未晒クラフトパルプ（UKP）のバイオブリーチングにおいて二酸化マンガンを還元し、生成した Mn（Ⅱ）イオンを MnP の生産及び MnP による脱リグニンに利用している。また Lip 活性を持たず、本菌株にとって MnP はリグニン分解のキーエンザイムと考えられる。こうした種の存在は、リグニン分解において MnP が果たしている役割が、従来考えられてきたものより重要であることを示唆するものである。しかしながら白色腐朽菌は、構造の不揃いなリグニンを分解するという魅力的な機能を有していながら、生育速度、および酵素等の物質生産性がネックとなる場合が多い。

本研究では遺伝子工学的手法による木質及びリグニン分解菌の育種を行うことを目的とする。まず、今年度は遺伝子組み替え、複合ベクターの構築等に必要な遺伝子材料を入手することを目的として *P. sordida* YK-624 株からの MnP 酵素遺伝子のクローン化ならびに構造解析を試みた。

国内では1500種のキノコが分類学的に明らかにされている。その約１％に当たる約15種が栽培され食用に供されている。中でもシイタケ、ナメコ、ヒラタケ、エノキタケの栽培は盛んで栽培技術も確立している。従ってエノキタケ（*Flamulina velutipes*）と、ヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）の子実体形成に関しては多くの報告がある。

リグニン分解菌としての利用を考えているヒラタケを実験材料として自前でいつでも作り出せる技術を確立しておくことと同時に、もう一つの目的は、子実体形成過程で行う菌掻きなどの操作を簡略化したり他の２、３の菌と混合培養（すなわち複合生物系）で培養することにより熟期を早めたり生産量を増すことにある。

子実体は、原木栽培（エノキ、ハンノキなどの原木を使用）、おがくず栽培、寒天培地上などで形成するが、今回は、主として寒天培地上で形成実験を室内で試みた。

国内の土壌糸状菌についてはつくば産の糸状菌の報告[5)]を含め多くの報告[6)]がある。しかし菌相については比較的少ない。そこでリグニンやセルロース分解菌候補の分離と複合生物系プロジェクト関連課題での利用を目的に捕捉用基質として爪楊枝とろ紙を用い工業技術院構内の土壌から糸状菌を分離したが、その結果は生物種多様性の解明とも関連し興味深く思われる。

本報告では、シロアリの体表に存在する糸状菌とその生息環境である腐朽材から分離される糸状菌について検討した。

2. 実験装置および方法

2.1 シロアリおよびカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術

2.1.1 シロアリ消化管内の微生物複合系の解析

(1)南西諸島におけるシロアリ類の採集

シロアリ個体を用いたリグニンモデル化合物の分解能の飼育実験による評価と、シロアリ微生物複合系の in vitro 培養系によるリグニンモデル化合物の分解能の評価等の実験材料に供するためのシロアリの採取を行った。共生微生物の種類組成はシロアリの種によって異なると考えられるため、広い分類群にわたるなるべく多種のシロアリを日本国内から採集することを目指した。このため、各種シロアリの既知の分布域を考慮し、短期間で多くのシロアリが採取できる南西諸島の屋久島、徳之島、西表島、与那国島の４カ所においてサンプリングを行った。採集は1997年11月10日より21日まで行った。

シロアリ以外の食材性昆虫も木質分解に関与する共生微生物を保有すると考えられるため、食材性のゴキブリ類とクワガタムシ類の採集を同時に行った。とくにゴキブリ類はシロアリ類と系統的に近縁であり、類似した共生微生物を持つことが期待される。シロアリ類は、必要なときに実験材料に用いることができるように半年程度はストックコロニーとして飼育できるだけの十分な量を採取する事を目指した。小個体数での長期飼育が難しいと考えられる種については巣ごと採取する等の工夫を行い、採取個体の移送は郵送を主とした。

(2)シロアリおよび共生微生物の調査

複合微生物複合系の解明のためにはまずどのような微生物が多様な系の構成要素として含まれているのかを解明することが必要である。同時にそれぞれの微生物複合系の進化過程を明らかにするためにも構成微生物組成の調査が必要である。このため、各種のシロアリの分布、生息状況、生態を調査するとともに、その消化管内の微生物組成をできる限り明らかにすることを目的として、オーストラリアと南アフリカ共和国において調査を行った。共生微生物の調査は、携帯用小型位相差顕微鏡を現地で用いて、シロアリの消化管をスライドグラス上で解剖した上で直接観察する方法で行った。

共生微生物組成の上から興味深いシロアリとしては、オーストラリア大陸北部熱帯域 Darwin 周辺のみに分布するムカシシロアリ（*Mastotermes darwinensis*）があげられる。また、オーストラリア東部の海岸沿いの温帯地域、タスマニア、南アフリカ南端部、南米チリの、南半球の諸大陸周辺部に遺存的に分布するミナミオオシロアリ（*Porotermes spp.*）とヒラタオオシロアリ（*Stolotermes spp.*）もその分布と系統分化・微生物組成の進化過程の対応という観点からきわめて興味深い。さらに、ミゾガシラシロアリ科（*Rhinotermitidae*）で、シロアリの系統関係等と共生微生物組成との対応の分析が行いやすいと考えられるため、この科に属する *Heterotermes, Coptotermes, Schedorhinotermes, Prorhinotermes, Psammotermes* の共生微生物のデータ収集を計画した。以上の種の分布域を考慮し、オーストラリアでは東北部亜

熱帯域の Townsville、北部熱帯域の Darwin、東南部温帯域の Sydney 周辺の 3 地域、南アフリカ共和国では南部温帯域の George、北部の乾燥域である Sporingbok の 2 地域を調査地として選んだ。各調査地周辺をレンタカーで移動しつつ調査を行った。調査はオーストラリアが1997年12月10日から12月21日、南アフリカが1998年 2 月 2 日から 2 月14日の日程で行った。

各調査地域での調査への協力と情報の提供をお願いするため、両国の各地域で以下の 4 人の研究者の方々を訪問した。

Townsville（オーストラリア）：
Dr. John A. Holt
CSIRO Land and Water, Davies Laboratory

Darwin（オーストラリア）：
Dr. Alan Andersen
Tropical Ecosystem Research Centre

Sydney（オーストラリア）：
Dr. Michael Slaytor
Dept. of Biochemistory, The University of Sydney

Pretoria（南アフリカ）：
Ms. Vivienne Uys
Plant Protection Research Institute (Agricultural Research Council)

(3)シロアリ類を用いた飼育実験系の条件設定

シロアリ類のリグニン分解能の評価を飼育実験系を用いて確かめるため、実験系の条件設定を行った。研究の第一段階として多種のシロアリを用いて分解能の評価を行うため、なるべく多くの種類を一定期間飼育できる条件を見いだす必要がある。このため、ろ紙及びセルロースパウダーを餌として小個体数でのシロアリの飼育を行い、3 週間をめどに生残率の検討を行った 。用いたシロアリはオオシロアリ（*Hodotermopsis japonoca*）、イエシロアリ（*Coptotermes formosanus*）は屋久島、コウシュンシロアリ（*Neotermes koshunensis*）、タカサゴシロアリ（*Nasutitermes takasagoensis*）は西表島、カタンシロアリ（*Glyptotermes fuscus*）は与那国島で採取した。同時に、食材性ゴキブリであるタイワンクチキゴキブリ（*Salganea esakii*、徳之島で採取）についても検討を行った。

飼育は径 5 cm のガラスシャーレ内で室温で行い、5-40個体（ゴキブリについては 1 個体ずつを導入した。

(4)宿主シロアリの分子系統解析および共生原生動物の SSUrRNA 遺伝子のクローニング

特に消化管内に共生する原生動物を主対象に、微生物各種の分子的キャラクタリゼーションを系統解析によって行うことと、微生物複合系の進化過程を解析することを目的として、宿主シロアリのミトコンドリア遺伝子（COⅡ）による系統解析と、原生動物

のSSU（16S-like）rRNA遺伝子のクローニングをおこなった。シロアリはミゾガシラシロアリ科の種を用いた。また原生動物は原生動物（*Pseudotrichonympha spp.*）を1種しか持たないミゾガシラシロアリ科の種を対象に行った。

クルードのDNAをキアゲンカラムを用いて抽出し、PCRで対象遺伝子を増幅後ゲルから切り出して精製した。精製後の遺伝子はシロアリの場合にはPCRに用いたプライマーでPerkin-Elmer（ABI）社のオートシークエンサにより塩基配列決定を行った。系統樹作成は近隣結合法により行った。原生動物の場合はファルマシア社のSure Cloneライゲーションキットを用いてpUC18ベクターにライゲーション後、大腸菌DH5株にクローン化した。

2.1.2　シロアリの木材分解酵素および関連酵素系について

(1)供試シロアリ

オオシロアリ、コウシュンシロアリ、、アマミキアシシロアリ（*Reticulitermes amamiensis*）、イエシロアリ、タカサゴシロアリ、ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*、つくば市市工業技術院内で採取）、ヤエヤマヤマトシロアリ（*Reticulitermes. yaeyamanus*、西表島で採取）を使用した。

(2)実　験　系

直径3.7cmのシャーレに、水50μlおよびリグニンモデル化合物を含浸させた広葉樹未晒クラフトパルプシート（直径2.6cm）を入れ、これに各種シロアリ（一飼育系に用いたシロアリ数は表1に示す）を添加して25℃で所定期間飼育した。

(3)リグニンモデル化合物

図1に示すようなβ-O-4型リグニンモデル化合物2種類（一飼育系につき5 mmol）およびコニフェリルアルコールより調製した合成リグニン（DHP; 2 mg）を実験に使用した。

(4)分　　析

飼育後、β-O-4型リグニンモデル化合物を添加した飼育系については、シロアリ・培地ともども超音波により破砕し、これより酢酸エチルを用いて代謝物を抽出し、酢酸エチル層は濃縮・乾固後、ガスクロマトグラフィーによりB環由来の4-メチルウンベリフェロンを定量した。ガスクロマトグラフィー分析条件を以下に示す。

カラム：TC-17（GL Sciences Inc.）、分析開始温度：120℃、インジェクション温度：270℃、ディテクター温度：280℃、昇温：10℃／分

DHPについては飼育後、シロアリ・培地ともどもジメチルホルムアミドに浸せきし、超音波破砕後、ジメチルホルムアミド層をゲル濾過クロマトグラフィーにより分析した。ゲル濾過クロマトグラフィー分析条件を以下に示す。

カラム：TSKgel G3000PW（Tosoh）、溶離液：50%ジメチルホルムアミド水溶液、流速：1 ml／min

2.1.3　シロアリ消化管内細菌の培養について

(1)実 験 材 料

1）食材性昆虫

ヤマトシロアリ、オオシロアリ、イエシロアリ、コウシュンシロアリ、ヤエヤマヤマトシロアリ、タカサゴシロアリ、カタンシロアリを用いた。それぞれの系統関係を表2[7]に示した。また、オオゴキブリ（*Panesthia angustipennis*、屋久島で採取)、タイワンクチキゴキブリ、クワガタムシの幼虫（西表島で採取)、カミキリムシの幼虫（工業技術院内で採取）を用いた。

2）シロアリ抽出液の調製

ヤマトシロアリを工業技術院内の松林腐朽木から採取し、プラスチックシャーレに870mg を集めた。試験管に入れ蒸留水を 4.35mℓ（200mg シロアリ／mℓ）加えた。約1分音波破砕し、100℃ で 30 分間加熱抽出した。10,000rpm で 5 分遠心分離して、その上清を 0.45mm のフィルターでろ過しさらに無菌的に 0.22mm のフィルターでろ過して、シロアリ抽出液とした。このシロアリ抽出液は、培養液に最終濃度が10%（v／v）となるように添加して用いた。

3）ルーメン液の調製

屠殺直後の牛の第一胃より得られるルーメン液を二重のガーゼでろ過し、－20℃で凍結保存した。使用前に必要量を溶かして 15,000rpm で 15 分遠心分離してその上清をとり、再度遠心分離を繰り返して、その上清を 121℃ で 20 分殺菌した。このルーメン液は、培養液に最終濃度が 20%（v／v）となるように添加して用いた。

4）リグニンモデル化合物

リグニンモデル化合物として、図1に示したB環に 4-メチルウンベリフェロンを有する β-O-4 型リグニンモデル化合物（Substrate Ⅰ）を用いた。

(2)培 養 条 件

1）培 養 条 件

好気培養は振とう培養（200rpm）で1週間、嫌気は培養は H_2-CO_2ガス（H_2:CO_2＝4：1）置換して 3 週間静置培養した。嫌気培養には還元剤（Na_2S, Cysteine・HCl）を各々 0.3mg／mℓ 添加した。培養温度は25℃と37℃を比較した。培養液の pH は、シロアリ腸内と同じ pH6.8 とした。

2）培　　地

培地には、DSM Catalogue（表3）[8]から 119 番を若干修正して用いた。また、リグニン分解活性のある放射菌である Microtetraspora 用の LSV 培地（表4）[9]を用いた。

3）菌液の調製

表5に示す濃度（腸内の原生動物が最も長く生存できた濃度）の食塩水 1 mℓ 当たりに各シロアリ 20mg の腸を懸濁してクリーンベンチ内でピンセットで腸内容物をしぼり出して、800rpm で 2 分遠心分離後、その上清を 2 %量（80 μl／4 mℓ 培地）添加した。 シロアリ以外の食材性昆虫の場合には、0.4%食塩水を用い、200mg 個体量

／mℓ食塩水となるように懸濁後、同様の方法で行った。

(3)活性測定方法

リグニンのモデル化合物であるウンベリフェロン・エーテル（Substrate Ⅰ）のβ-O-4エーテル結合の切断による4-メチルウンベリフェロンの蛍光を測定した。培養液を酢酸エチルで抽出し、10倍に濃縮して10μlをTLCプレート（Merck社製Silicagel 60 F254）にスポットし、トルエン：酢酸エチル＝4：1で展開し、UV365 nmでの蛍光を測定した。

2.2 木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術

2.2.1 リグニン分解複合系の構築と探索

(1)合成高分子リグニンDHPの調製

0.1Mリン酸カリウムbuffer, pH6.0, 100mℓとアセトン100mℓを混ぜたものに対して、3mgの西洋わさびPeroxidase（和光No.165-10793, 100units／mg solid）を溶かした溶液を340mℓ準備し、これにConiferyl alcohol 2％アセトン溶液50mℓと3％H_2O_2溶液20mℓを室温で攪拌しながら、ゆっくりと14hrかけて滴下した。滴下終了後、さらに2mgのPeroxidaseを添加し、12hr攪拌を続けた。反応液を4,000rpmで10分遠心分離し、沈澱を得た。純水に懸濁して遠心分離をする洗浄操作を3回繰り返し、デシケーター中五酸化リンで脱水して、粗精製DHPを得た。ジオキサン90％水溶液に溶解後、エーテル中に滴下して4,000rpm、10分の遠心分離で沈澱物を得る操作を繰り返して精製標品とした。

(2)活性測定方法

西田らの方法に準じた[10]。DHP 1mgを90％ジオキサン水溶液100mℓに溶解し、ガラス繊維濾紙（アドバンテック社製、GA-55、直径21mm）に含浸させた。ジオキサンをドラフト中で蒸散後、PDA培地プレート上中央部に置き、その濾紙中央部に供試菌を接種した。28℃で2週間培養後、濾紙上の菌糸を取り除き、0.05N NaOHで28℃、2時間振盪して分光光度計で280nmの吸光度を測定して、ガラスフィルター上のDHPの残存量を算出した（図2）。

2.2.2 白色腐朽菌の木材分解に関与する酵素系の探索

(1)供　試　菌

白色腐朽菌*P. sordida* YK-624株（ATCC 90872）を使用した。

(2)培　養　系

1）セルロース分解時検出されるferrireductase活性

100mℓの三角フラスコに工場製広葉樹未晒クラフトパルプ2g及び水4mℓを添加し、121℃、15分間オートクレーブにより滅菌した。これに供試菌より調整した菌体懸濁

液（15mg／mℓ）4 mℓを添加し、30℃で所定期間静置培養した。

2）siderophore様化合物の生産

直径15cmのシャーレに鉄及びコバルトを含まないKirk液体培地50mℓおよび供試菌を添加して、12日間30度で静置培養した。

(3) siderophore様化合物の調製

培養後、菌体は除去し、培養液を凍結乾燥後、70%アセトン不溶部を調製した。これをSephadex G-25カラムにより精製した試料をsiderophore様化合物として使用した。

(4)酵素活性測定

MnP活性[11]、ferrireductase[12]、cellobiose dehydrogenase[13]活性は参考文献にそって測定した。

2.2.3 木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術

(1)供 試 菌

P. sordida YK-624株、またコントロールとして*Phanerochaete chrysosporium* ME-446株[14]を使用した。

(2) MnP酵素遺伝子のクローン化

既存のMnP酵素遺伝子よりコンセンサスな配列をもとにPrimerを設計し、*P. sordida* YK-624株の染色体DNAを鋳型としたPCR法によりMnP酵素遺伝子の増幅を試みた。まず染色体DNAの抽出を以下の方法に準じて行った。供試菌をPDA培地にて前培養後、菌体ディスク数個を200mℓのPDB培地に加え30℃で一週間振とう培養した。MIRACLOTHを用いて集菌し、菌体を0.8%NaClで洗浄後、凍結乾燥を行った。磁性乳鉢にて菌体をすりつぶし、さらに染色体DNAを抽出した（図3）。Primerの設計は以下に従って行った。同じgenusである*P. chrysosporium*由来のmnp-1、mnp-2、mnp-3のコンセンサス配列をもとにDegenerative primer（Sense Primer : DHF, MNF）（Antisense Primer : PHR, MNR1, MNR2）（30〜36mer、8〜16x）を作製した（図4）。上記に従って抽出した供試菌の染色体DNAを鋳型としてPCR反応を行った。DNA PolymeraseはFidelityの高い3′-5′exonuclease活性（Proofreading活性）を有するTaKaRa Ex Taqを用いた。またPCR反応は以下の条件で行った。1 cycle（94℃, 2 min）、30 cycle（94℃, 1min, 70℃, 1min, 72℃, 2 min）、1cycle（72℃, 10min）、$MgCl_2$濃度2.0mM。

(3) MnP酵素遺伝子の構造解析

得られたPCR産物をクローン化し、塩基配列の解析ならびにホモロジー検索を行った。1.5%アガロースゲル電気泳動（TAE buffer）によりPCR反応物の確認を行い、*P. chrysosporium* ME-446株と*P. sordida* YK-624株における泳動パターンの比較

を行った。増幅されたPCR産物を大腸菌ベクターpT7-Blue（Novagen社）にTAクローニングし、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からのプラスミドの抽出を行い、インサートの有無を確認後、得られたクローンの塩基配列をPerkin Elmer社のDNA Sequencer ABI 373Aを用いてDye-terminator法により解析し、さらにBLASTプログラムを用いてホモロジー検索を行った。

2.3 リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術

2.3.1 ラッカーゼのメディエーターの探索技術

(1)真菌および放線菌の培養

土から分離した真菌および放線菌を真菌はF1培地（ポテトデンプン2％、グルコース1％、エスサンミート2％、KH2PO40.1％、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05％）、放線菌はC培地（ポテトデンプン2％、グルコース2％、エスサンミート2％、酵母エキス5％、NaCl 0.25％、$CaCO_3$ 0.32％）で4日間、28℃で振盪培養して培養液を得る。

(2)培養液からのアッセイ用試料の調製

培養液から遠心分離によって上清を得、3分間煮沸して酵素を失活させ、アッセイ用の試料を調製する。

(3)ラッカーゼのメディエーターのアッセイ法

1.5mℓ容のエッペンドルフチューブに0.2M酢酸緩衝液（pH 5.0）75μl、ラッカーゼ15μl、30mM veratrylalcohol 15μl、培養上清45μlを入れて28℃で一晩反応させる。その後、メタノール200μlを加えた後、16000rpmで5分間遠心して不溶物を除き、HPLC分析によってveratraldehydeを定量する。HPLC分析条件は、カラム：ODS（6×150mm）、移動相：70％MeOH、流速：0.5ml／min、検出：280nm。

2.4 微生物相互作用による分化制御因子の利用技術

2.4.1 エノキタケ、ヒラタケなど担子菌類の子実体形成におよぼす他の微生物の影響

(1)供試菌株

子実体形成用の担子菌としてエノキタケ3菌株（菌株86-1, 98-1, 98-2, 98-5）、ヒラタケ（*Pleurotus ostrateus*）5菌株（86-98, 86-100, 88-8, 88-11, 98-3）、アミスギタケ1菌株［*Polyporus*（*Favolus*）*arcularius* F1268］などを適宜使用した。子実体形成促進菌の候補菌として*Mortierella*属菌を中心に14菌株の糸状菌を試験した。

(2)培　　地

供試した8種以上の培地は自家製ジャガイモ煎汁（PD broth）、ジャガイモ煎汁寒天培地（PDA、市販品と自家製）、麦芽寒天培地（malt agar, MA）、トウモロコシ寒天培地（corn neal agar, CMA）、エンバク寒天培地（oat meal agar, OMA）、お

がくず・米ぬか培地（ブナおがくず・米ぬかの重量比4：1（文献では容積比10：1-3、含水量65%が一般的）、R培地（ジャガイモ煎汁200gからの煎汁，寒天20g、ブドウ糖20g、マルトース5g、麦芽煎汁（malt extract）、酵母エキス、ポリペプトン各1gと水1000mℓの栄養豊富の自家製培地）、5%どペプトン入りのMA培地などである。

(3)培　　養

培養は試験管、ガラス瓶（500mℓ容）とプラスチック瓶（600mℓ容）を使用した。試験管培養ではPD broth培養で、他の容器では様々な培地を用いた。菌糸が容器内に蔓延後、掻き取り操作、素寒天被覆などを行った。

2.5 植物共生微生物の利用技術

2.5.1 爪楊枝とろ紙で捕捉したつくば産の土壌糸状菌とその菌相

工業技術院構内の8-10箇所を選び現場から直接爪楊枝で菌を捕捉するか、同じ場所から土壌を採集し糸状菌を分離した。すなわち現地から菌を分離するため各地点に5本ずつ爪楊枝（材質 シラカバ）を深さ4.5cmまで垂直に立てて1ヶ月間自然状態に放置し30日後に回収した。なお自然土壌下ではろ紙による菌の捕捉は行わなかった。また土壌試料の採取のためには各採取地点当たりさらに任意の5ヶ所を選び深度15cmまでの表土を混ぜて80mℓ容のガラス瓶に入れ各採取地点当たり2瓶の試料を用意した。各土壌試料（18.7-37.4g／瓶）に匹敵する容量（体積）の殺菌水を加え、3種のろ紙（Advantec）と2本の爪楊枝を入れた。爪楊枝は全体の2／3を土壌に立ててさした。このように処理した爪楊枝またはろ紙を25℃に30日間放置後回収した。これらの回収した爪楊枝やろ紙は軽くブラッシをかけながら流水下で水洗、水をペーパータオルで取除いて素寒天培地WAにプレートし25℃で1-2日間培養した。各基質からWA上に伸び出た菌糸から単菌糸を選び純粋分離株を得た。

爪楊枝の変色度を比較するために5段階の変色指数を設け、各楊枝の変色長に変色指数をかけた値を変色度とし各試料の1本の楊枝当たりの相対的な変色度を計算し比較した。

2.5.2 シロアリとシロアリ生息環境から分離される糸状菌

(1)シロアリとシロアリが生息している腐朽材の採取

ヤマトシロアリとそれらが生息している腐朽材は、つくば市工業技術院内の2個所（東側と北側中央部）と屋久島で採取した。オオシロアリとそれらが生息している腐朽材は屋久島で採取した。

(2)糸状菌の分離

シロアリは30分間流水洗浄後、素寒天上で頭と胴を切断して、頭と胴をそれぞれ素寒天上の別な場所に置き、22℃で2日間または10℃で5日間培養した。実体顕微鏡で観察しながら菌糸を切断してPDAに移し、22℃で1週間以上培養した。シロアリの生息している腐朽材の方は、小片をそのまま素寒天上に置き、他はシロアリの場合と同様

にして行った。

(3)糸状菌の同定

PDA 培地上で22℃、1週間以上培養したものの胞子の着生状態を顕微鏡で観察して、Pictorial atlas of soil and sead fungi[15] に則って同定した。

3. 結果および考察

3.1 シロアリおよびカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術

3.1.1 シロアリ消化管内の微生物複合系の解析

(1)南西諸島におけるシロアリ類の採集

採集されたシロアリ類を中心とする食材性昆虫のリストを表6に示す。シロアリについては4科6属にわたる計10種を採集した。これらのシロアリは基本的には営巣材ごと大型スチロールケースもしくはタッパーウェアーに入れたまま持ち帰り、そのままストックコロニーとしたが、カタンシロアリは大型の衣装ケースに移し替えて飼育した。またタカサゴシロアリはワーカー・ソルジャーのみでの飼育が困難であるため、カートン巣ごと採取し大型衣装ケースで飼育した。

これらのストックコロニーは予備飼育実験に使用すると共に、シロアリおよび培養した消化管内微生物によるリグニンモデル化合物の分解実験の材料に供した。

(2)シロアリおよび共生微生物の調査

オーストラリアおよび南アフリカにおいて調査したシロアリのリストを表7に示す。シロアリ全7科中6科にわたる、分類的にはかなり広範な種を調査することが出来た。このうち、シロアリ科をのぞく5科（ムカシシロアリ科・オオシロアリ科・シュウカクシロアリ科・レイビシロアリ科・ミゾガシラシロアリ科）では消化管内にバクテリアと共に原生動物を保有する。原生動物組成の調査結果のうちで、これまで未報告の種に関するものを表8に示す。

ミゾガシラシロアリ科のシロアリは *Pseudotrichonympha, Holomastigotoides, Spirotrichonympha* の3属を中心とする原生動物の属組成を持つものが多い事がわかる。この点はこれまで調べられている同科のシロアリと共通する特徴である[16]。ただし例外的に *Parrhinotermes* 属は *Pseudotrichonympha sp.* 一種のみしか共生原生動物をもたない事が明らかになった。

レイビシロアリ科の *Glyptotermes sp.* はミゾガシラシロアリ科の種とは大きく異なる原生動物の属組成を持つ。属組成としては他の *Glyptotermes* 属の多くのシロアリと同様な特徴（*Devescovina, Macrotrichomonas, Foaina* 等を保有する）を持ち、さらに *Trichonympha* 属の種を持つことは日本におけるサツマシロアリ（*Glyptotermes satsumensis*）等の大型 *Glyptotermes* 属に共通してみられる特徴である。シロアリの分類群ごとに類似した原生動物組成を持つことは、宿主シロアリの系

統関係が原生動物の系統関係に強い影響を与えていることを示唆するものと考えられる[17]。

(3)シロアリ類を用いた飼育実験系の条件設定

ろ紙およびセルロースパウダーを餌として用いた各種シロアリの予備的飼育実験（表9）を行い、結果を表10に示す。3週間の飼育実験ではイエシロアリの1例をのぞく全ての種で90%以上の生残率を示し、この程度の期間であれば飼育実験には支障がないものと思われた。ただし5週間の飼育では個体数のかなり減少する実験コロニーが生じた。

(4)宿主シロアリの分子系統解析および共生生動物のSSUrRNA遺伝子のクローニング

これまで明らかになったミゾガシラシロアリ科のシロアリの各種の系統関係を図5に示す。ミゾガシラシロアリ科は大きく*Rhinotermitinae*亜科からなるクレードとそれ以外の亜科からなるクレードに二分されることがわかった。また*Herterotermes*属は形態的にきわめて類似したヤマトシロアリ属ではなくイエシロアリ属と姉妹群になるという結果が得られている。腸内原生動物組成との対応については、特異的な原生動物組成を持つヤマトシロアリ属がbasal branchにはならないことから、この特異的な組成は異種間感染によって成立した可能性が高いとおもわれる。1種のみの原生動物を持つ*Parrhinotermes*属と*Termiotogeton*属は姉妹群にはならず、1宿主－1共生者関係は独立に進化したと考えられる。

原生動物のSSUrRNA遺伝子に関してはこれまで*Pseudotrichonympha*属の3種を*Termitogeton planus*, *Parrhinotermes queenslandicus*, *Parrhinotermes sp.*（いずれもミゾガシラシロアリ科）の消化管内容物由来のDNAよりクローン化している。

3.1.2　シロアリの木材分解酵素および関連酵素系について

(1)各種シロアリによるβ-O-4型リグニンモデル化合物の分解

まず、各種シロアリのリグニン分解力をSubstrate Ⅰを用いて測定した（図6）。培養1週間で、5～13%の4-メチルウンベリフェロンの生成が観察された。今回パルプシートに均一にリグニンモデル化合物を含浸させたので、シロアリによるシート摂取量がリグニンモデル化合物分解活性に大きく影響すると考えた。そこで、シロアリによるパルプシート摂取量を求め、図6の値をパルプシート摂取量で割り、シロアリ体内へ取り込まれたモデルの分解率を算出した（図7）。この結果より、アマミキアシシロアリ、タカサゴシロアリ、イエシロアリはモデルの分解に優れていることが判明した。

さらにsubstrate Ⅱを用いて同様に実験を行った結果を図8に示す。供試シロアリとしてオオシロアリ、タカサゴシロアリを用いたが、タカサゴシロアリについては飼育1週間で全て死滅した。オオシロアリについてはSubstrate ⅠおよびⅡともに同じ様な分解率を示した。白色腐朽菌の場合、分解の反応点はフェノール性水酸基であることが予想されており、興味深い知見である。ただ、タカサゴシロアリではsubstrate Ⅱ

では全て死滅してしまったので、フェノール性水酸基を有する substrate Ⅱ が殺蟻効果を有することも加味しなければならない。この点については腸内微生物を用いた分解実験で判定する必要がある。

上記の実験は2量体モデルであるため、実際のリグニンの分解を象徴しているかどうかは不明瞭である。そこで、モデル分解率が高かったオオシロアリ、およびシロアリ体内へ取り込まれたモデルの分解率の高かったイエシロアリを用いて、DHP の分解実験を行った。オオシロアリでは DHP の分解（低分子化）はあまり観察されず、DHP の λmax の長波長シフトが観察された。イエシロアリでは DHP の λmax の長波長シフトが観察されながらも、DHP の減少が観察された。DHP の λmax の長波長シフトが観察されたということは、リグニンの酸化が起こっていることが考えられる。今後さらに検討する必要がある。

3.1.3 シロアリ消化管内細菌の培養について

(1)培地および培養条件

嫌気培養では蛍光がほとんど認められなかったので、好気培養についての結果のみを表10に示す。表10より明らかなように、25℃ 培養よりも37℃ 培養の方が、また LSV 培地よりも DSM119M 培地の方が蛍光が強く、リグニンモデル化合物の分解活性が高いことが示された。また、シロアリ抽出液には効果が認められなかったが、ルーメン液には明らかに添加効果が認められ、より高いリグニンモデル化合物の分解活性を示した。

(2)各種シロアリ消化管内細菌での比較

培養は好気的条件下、DSM119M 培地、37℃ で振盪培養を1週間行った以外は3.1と同様に行った。ただし、ルーメン液を培地に添加したもの（ルーメン＋）と添加しないもの（ルーメン－）でリグニンモデル化合物の分解活性を比較した。シロアリとしては、オオシロアリ、コウシュンシロアリ、カタンシロアリ、ヤマトシロアリ、ヤエヤマヤマトシロアリ、イエシロアリおよびタカサゴシロアリを用いた。各々のシロアリから調製した細菌の増殖度とリグニンモデル化合物の分解活性を表11に示す。その結果、各種シロアリでルーメン液の添加効果が認められ、特にオオシロアリ、ヤマトシロアリ、ヤエヤマヤマトシロアリ、およびイエシロアリで比較的強い活性が認められた。

(3)シロアリ以外の食材性昆虫での活性

シロアリ以外の食材性昆虫として、オオゴキブリ（屋久島産）、タイワンクチキゴキブリ（徳之島産）、クワガタムシの幼虫（西表島産）およびカミキリムシの幼虫（つくば産）、そして食材性昆虫でない一般昆虫としてワラジムシ（つくば産）を用いて、3.2と同様の条件で、リグニンモデル化合物の分解活性を比較した（表12）。ただし、菌液の濃度は昆虫の個体重200mg の腸／mℓ 0.4% NaCl とした。表13に示すように、シロアリ以外の食材性昆虫においてもルーメン液添加によるリグニンモデル化合物の分解活性の上昇が認められた。

3.2 木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術

3.2.1 リグニン分解複合系の構築と探索

(1)単一菌株での DHP の分解

保存株の中から白色腐朽菌を選び出してその DHP 分解活性を測定した。表 14 に示すように、ヒラタケ（*Pleuroteus ostrateus*）では F1294 株が 35.6% の分解率、カワラタケ（*Coriolus versicolor*）では F1265 株が 25.8% の分解率、そして *P. chrysosporium* が 20.2% の分解率を示した。

3.2.2 白色腐朽菌の木材分解に関与する酵素系の探索

(1)セルロース分解時検出される ferrireductase 活性

今回セルロース試料として、広葉樹未晒クラフトパルプを使用した。これは自然界におけるセルロース分解がリグニン共存下で行われていることを踏まえて、純度の高いセルロースよりリグニンを若干でも含んでいる資料の方が適していると判断したためである。結果を図 9 に示す。*P. chrysosporium* 等で検出されている cellobiose dehydrogenase は検出されなかった。この酵素は Fe（Ⅲ）を還元する酵素として着目を集めているが、今回の供試菌では検出されなかったことから、ferrireductase のような他の還元酵素が Fe（Ⅲ）に関与していると思われる。また、培地糖含量、MnP および ferrireductase 活性はほぼ同じ様な傾向を示した。培地糖含量の増加は、クラフトパルプより分解生成したと思われ、この結果より ferrireductase は Scheme 1 に示すような二酸化マンガンの還元のみならず、培地セルロースの分解にも関与している可能性が示された。

(2) siderophore 様化合物の諸特性

一般的に siderophore 様化合物は Fe（Ⅱ）より Fe（Ⅲ）に特異的に結合することが報告されているが、白色腐朽菌 *P. sordida* YK-624 株より得られる siderophore 様化合物ではどうか、検討した。同濃度の Fe（Ⅱ）もしくは Fe（Ⅲ）を siderophore 様化合物溶液に添加し、その後ゲル濾過クロマトグラフィーを行った（図 10）。ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて siderophore 様化合物は溶出容量 140〜160mℓ の位置に溶出するが、その画分の鉄濃度を測定したところ、Fe（Ⅱ）より Fe（Ⅲ）を添加した siderophore 様化合物の方が鉄濃度が高かった。つまり、白色腐朽菌 *P. sordida* YK-624 株より得られる siderophore 様化合物は Fe（Ⅱ）より Fe（Ⅲ）の方に特異的に結合することが判明した。

3.2.3 木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術

アガロースゲル電気泳動により PCR 反応物の確認を行ったところ、複数のバンドの増幅が確認された。また、*P. chrysosporium* ME-446 株の染色体 DNA を鋳型として用いた場合と類似した泳動パターンが得られたため、MnP 酵素遺伝子はイントロンを介して両菌株間で高く保存されているものと考察した（図 11）。さらに BLAST プログラムを

用いてホモロジー検索を行った結果、*P. chrysosporium* ME-446 株由来の Mn-peroxidase に DNA レベルで約 65〜70% の高い相同性を示す互いに異なる計 6 種のクローン（DHF〜MNR2 で 1 種、MNF〜MNR1 で 3 種、MNF〜PHR で 1 種、MNF〜MNR2 で 1 種）を取得した（図 12)。またこれらのクローンはいずれも *P. chrysosporium* ME-446 株由来の Lignin peroxidase よりも Mn-peroxidase に DNA レベルで高い相同性を示した。以上よりこれらの遺伝子群は Mn-peroxidase であり、本菌株において複数の MnP アイソザイムが存在していること、並びに複数のアイソザイムの存在により本菌株が複雑なリグニン分解への多様性・柔軟性を獲得してきたものと考察した。

3.3 リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術

3.3.1 ラッカーゼのメディエーターの探索研究

これまでに土壌から分離した真菌及び放線菌、各 1280 株のアッセイを終了し、内 17 株の培養液の上清にラッカーゼのメディエーター様活性を認めた。しかし、これらのメディエーター物質がリグニンの酵素的分解においてどのような働きをしているのかは分かっていない。これらの株はいずれも真菌であった。更に再現性とメディエーター活性の強さを測定し、活性の強い株からメディエーター物質の単離精製を行っていく。

3.4 微生物間相互作用による分化制御因子の利用技術

3.4.1 エノキタケ、ヒラタケなど担子菌類の子実体形成におよぼす他の微生物の影響

エノキタケとアミスギタケで子実体形成が認められた。複合生物系として各種土壌菌、種子汚染菌や木材生息菌など他の 2 、3 の菌を選び混合培養を行い子実体形成に及ぼす影響を検討することにあるが、この方面の研究では、ある種の細菌や真菌による子実体形成の促進例[18)19)]がある。逆に担子菌による子嚢菌の子嚢殻や子嚢胞子形成の促進例[20)]もある。

今回の限られた試験では、対照でさえも子実体形成が満足に行われず、複合生物の影響を検討するには至らなかった。先ず湿度や光などの栽培環境や培地などを検討しなければならないが、栽培環境も整ってい。ヒラタケよりも短期間で容易に寒天培地上で子実体形成を行うアミスギタケなどを中心にして、子実体形成促進菌有望株のスクリーニング法を今後検討したい。

3.5 植物共生微生物の利用技術

3.5.1 爪楊枝とろ紙で捕捉したつくば産の土壌糸状菌とその菌相

土壌の採集地点で楊枝の変色度には明らかな差異が認められた（図 13、14)。分離された糸状菌は合計 15 属で爪楊枝では 11 属、ろ紙では 13 属が分離され、その内 8 属が共通していた。さらに未同定菌も菌そうの違いなどから 25 分類単位以上に分類できた（表 15)。また爪楊枝上で胞子形成していた *Helicomyces* 属菌など多数の菌が直接観察された（図 15）が、未同定菌の中にこれらの菌を含む可能性も大きい。

処理した爪楊枝やろ紙の変色度とリグニンやセルロース分解との関連は今後の研究によるが、マツ材の変色に *Penicillium* 菌の汚染例[21] で示されたように材の変色は市場価値を下落させるのは明らかであり、汚染菌自体の検索だけでもさらに追求の価値がある。また分離結果はただ一つの特殊な分離法に基づいており土壌菌相の全体図を必ずしも示さないが、生物種多様性の解明とも絡んでおり意義あることと思われる。この中には国内では殆ど報告のない数種の珍菌や新種も含まれており、それだけ有用菌の候補として利用価値が高まるものと思われる。

3.5.2 シロアリとシロアリ生息環境から分離される糸状菌

(1)ヤマトシロアリ（つくば、工業技術院内）とその生息環境から分離された糸状菌

ヤマトシロアリ個体から分離された糸状菌を表 16、生息環境から分離された糸状菌を表 17 に示した。生息環境からは、工技院の東側から分離した場合でも、北部中央部から分離した場合でも 22℃ では *Trichoderma* 属が主で、その他 *Mortierella* 属であったり、*Gliocladium* 属であったりして、10℃ では *Mortierella* 属が主で、その他 *Trichoderma* 属や *Sclerotium* 属であったり、*Trichoderma* 属や *Cylindrocarpon* 属であったりした。ヤマトシロアリ固体からは、比較的採取場所固有の糸状菌が得られ、東側では *Arthrinium* 属が多かったのに対し、北側中央部では *Acremonium* 属が比較的多く分離された。

(2)ヤマトシロアリ（屋久島）とその生息環境から分離された糸状菌

屋久島のヤマトシロアリ個体から分離された糸状菌を表 18、生息環境から分離された糸状菌を表 19 に示した。生息環境からは、工技院の場合と同様に、22℃ では *Trichoderma* 属が主で、その他 *Mortierella* 属や *Gliocladium* 属が分離され、10℃ ではほぼ *Mortierella* 属のみが分離された。ヤマトシロアリ固体からは、22℃ でも 10℃ でも *Mortierella* 属が多く分離され、その他 22℃ では *Cunninghamella* 属が分離された。

(3)オオシロアリ（屋久島）とその生息環境から分離された糸状菌

屋久島のオオシロアリ個体から分離された糸状菌を表 20、生息環境から分離された糸状菌を表 21 に示した。生息環境の腐朽材からは、これまでと同様 22℃ では *Trichoderma* 属が主で、その他 *Mortierella* 属や *Gliocladium* 属や *Penicillium* 属が分離され、10℃ ではほぼ *Mortierella* 属が分離された。オオシロアリ固体からは、*Penicillium* 属が多く、その他 *Mucor* 属が分離された。

4. 結　　語

4.1 シロアリおよびカミキリムシ等の消化管共生微生物の利用技術について

今年度はプロジェクト開始直後であり、材料と基礎情報の収集や実験系・ストックの準備をかなり重点的に行った。シロアリの予備的飼育実験の結果から、長期の実験的飼育を

行うにはさらに窒素源や微量金属元素を添加するなどの餌条件の検討が必要と思われる。共生微生物の分子的キャラクタリゼーションについては、今年度は原生動物について条件設定と実験を開始したが、今後さらにバクテリアについても中心的な研究対象とする宿主を絞った時点で行う予定である。とくにリグニン分解にどのような微生物が関与しているかを押さえ、それらの間の相互作用と複合系の進化過程を明確化する際に宿主昆虫の系統解析とあわせてこのような手法は威力を発揮するものと思われる。

以上の実験より、オオシロアリは木材腐朽力は優れているものの、リグニン分解力は大きくないことが示唆された。一方、イエシロアリでは木材腐朽力は大きくないが、リグニン分解力は優れていることが予想された。今後の展望として、入手が容易であるイエシロアリの腸内微生物を解析し、リグニン分解能に優れた微生物を単離・培養することで、リグニン分解力が改善されると思われる。

また図8にも示すように、フェノール性水酸基の有無に関わらず分解活性がさほど変わらなかったので、シロアリによるリグニン分解の基点はフェノール性水酸基ではないであろう。今後さらにモデル分解実験を行い、分解代謝物を同定することで分解機構を推定していく予定である。

シロアリによるDHP分解実験において、DHPの λmax の長波長シフトが観察されたが、これらの点は、^{13}C-DHPの分解実験を行い、NMRにより解析する予定である。また分析的熱分解法によりシロアリ代謝後のDHPの構造を推定していく予定である。

これまでの実験により、シロアリ等の食材性昆虫の消化管内細菌の培養液において、リグニンモデル化合物であるウンベリフェロン・エーテルの β-O-4エーテル結合が切断されることが明らかとなった。また、本活性がルーメン液を添加することによって上昇することが示された。今後は、ルーメン液の添加効果を解析するとともに、さらに培地条件等を検討して、活性菌株の単離および純粋培養について検討する。

4.2　木質分解複合微生物系の構築と複合ベクター系の開発技術について

ヒラタケ、カワラタケおよび *P. chrysosporium* 単独でのDHP分解活性を調べた。今後は、複合系でのDHP分解活性について検討する。

白色腐朽菌 *P. sordida* YK-624株によるクラフトパルプの分解において、セルロースの分解にferrireductaseが関与していることが予想されたが、培養後期ではセルロース分解量に対して高いferrireductase活性が検出されている。これは以前の報告で、白色腐朽菌によるクラフトパルプのバイオブリーチングにおいて培養後期に二酸化マンガンの蓄積が観察され、これを還元するためにferrireductaseが生産されたということが考えられる。今後はferrireductase酵素遺伝子のクローニングを行うとともに、セルロース分解時に観察されるferrireductaseに関連するmRNAの定量を行い、ferrireductaseの重要性についてさらに知見を深める。

リグニン分解能の極めて優れた *P. sordida* YK-624株は複数のMnPアイソザイムを有していることが推察された。しかしながら生化学的には3つのアイソザイムしか存在が確認されておらず、実際に機能するMnP酵素遺伝子を取得するにはリグニン分解条件において合成されるcDNAのクローン化とMnP酵素の精製によるN末端アミノ酸配列の

決定を今後急ぐ必要がある。また、*P. sordida* YK-624 株と *P. chrysosporium* ME-446 株の両菌株間では、広葉樹未晒クラフトパルプ（UKP）のバイオブリーチングにおいてリグニン分解能及び MnP 活性に顕著な差が見られることから[11]、MnP をコードする遺伝子座のプロモーター配列およびその活性発現様式も非常に興味深い。本研究の目的である木質及びリグニン分解菌の育種を考えた上では担子菌を微生物育種としての宿主として用いるには問題点が多い。例えば①生育が遅い、②分生子をつくる環境条件を入手できてない、③形質転換系の新たな構築の必要性、④分子生物学的に解析が遅れている等である。その点、Genetics の利用が容易で、さらに 酵素の発現能力に優れている *Aspergillus oryzae* は微生物育種として用いるには最も適切ではないかと思われる。しかしながら MnP の活性発現には Mn イオン、H_2O_2、ヘムなど複数の補因子の存在が不可欠で、これらに何らかの形で関与してくる遺伝子または酵素も、遺伝子ターゲッティングの対象としては無視できない。その意味では担子菌におけるリグニン分解の分子メカニズムを詳細に解析することも必要ではないかと思われる。

4.3　リグニン分解酵素の制御因子の探索と利用技術について

土壌から分離された真菌および放線菌の培養液中からラッカーゼのメディエーターを探索するためのアッセイ系の構築を行い、実際にスクリーニングを開始した。その結果、幾つかの真菌の培養液中にメディエーター様活性を検出した。これらのメディエーター物質が実際にリグニンの酵素分解においてどのような働きをしているのかは今後の課題であるが、ラッカーゼによる酸化反応においては、その存在によって非フェノール性の化合物を酸化できることは、ラッカーゼの活性中心における酸化機構を考えるとき興味深い。リグニンの生分解は化学的にまだ分からないことが多く、その解明は遊離ラジカルの化学の発展にもつながると言える。また、この分野で得られた知見は単にリグニンの有効利用に留まらず、パルプ製造業における化学的処理工程の代替法（バイオパルピング、バイオ漂白）の開発や新たな酵素合成法の開発などへ発展する可能性を秘めている。

4.4　微生物間相互作用による分化制御因子の利用技術について

培養環境の整備と供試菌株の選択の重要性など、子実体形成実験を実際にはじめてみてその難しさを知った。今後与えられた条件下で少しずつ栽培環境の向上を計らねばならないと思う。

4.5　植物共生微生物の利用技術について

現在分離菌は分類・同定の過程であり全体像を描くことはできない。今後代表株の接種試験を行いリグニンやセルロース分解菌を明らかにしたい。

各種シロアリの生息環境である腐朽材から分離される糸状菌は一定の傾向を示し、22℃で分離した場合は *Trichoderma* 属を主とし、10℃ で分離した場合はほぼ *Mortierella* 属を主としていた。しかし、各種シロアリ固体から分離される糸状菌は各コロニーに特有であり、同じ工技院内でも採取した場所の異なるコロニーでは、分離されてくる糸状菌も

異なる傾向が明らかとなった。今後は、それらの糸状菌とシロアリとの関係について検討する。

5. 参考文献

1) Butler, J. H. A. and Buckerfield, J. C. : Digestion of lignin by termites : Soil. Biol. Biochem, 11, 507-513 (1979).

2) 志水一允：バイオマス変換計画研究報告「高能率リグニン分解菌の検索とその利用技術Ⅰ」：農林水産省農林水産技術会議事務局, 第1号, p1-6 (1986).

3) 桑原正章：生物機能を利用した地球環境改善技術に関する調査―リグノバイオプロセスの構築―：新エネルギー・産業技術総合開発機構, NEDO-GET9402, p10-18 (1994).

4) 桑原正章：生物機能を利用した地球環境改善技術に関する調査（Ⅱ）―リグノバイオプロセスの構築―：新エネルギー・産業技術総合開発機構, NEDO-GET-9514, p9-17 (1995).

5) Davidson, R. W. : Brown and red stain in Ponderosa pine lumber : Mycologia, 77, 494-496 (1985).

6) Watanabe, T. : Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Lewis Publishers, Boca Ratoon, Fl., U.S.A. (1994).

7) Pearce, M. J. and Waite, B. S. : A list of termite genera (Isoptera) with comments on taxonomic changes and regional distribution : Sociobiology, 24, 247-263 (1994).

8) Stackebrandt, E. : DSM Catalogue of Strains 1993, Deutsche Samml ung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, fifth edition, p361-362 (1993).

9) Hayakawa, M., Momose, Y., Yamazaki, T. and Nonomura, H. : A method for the selective isolation of Microtetraspora glauca and related four-spored actinomycetes from soil : J. Appl. Bacteriol., 80, 375-386 (1996).

10) 西田友昭：木材腐朽菌によるリグニン分解（第5報）リグニン分解活性の検定方法：木材学会誌, 35, 675-677 (1989).

11) Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. : Screening of lignin-degradation fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp : Mokuzai Gakkaishi, 40, 980-986 (1994).

12) Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. : NADPH-dependent ferrireductase produced by white-rot fungus Phanerochaete sordida YK-624 : J. Wood Science, in press (1998).

13) Bao, W., Usha, S. N. and Renganathan, V. : Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium : Arch. Biochem. Biophys., 300, 705-713 (1993).

14) Godfrey, B.J et al. : Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium : Gene, 93, 119-124 (1990).

15) Watanabe, T. Pictorial atlas of soil and seed fungi : Lewis Publishers, p39-

398 (1994).

16) Kitade, O. and Matsumoto, T. : Characteristics of the symbiotic flagellate composition within the termite family Rhinotermitidae (Isoptera) : Symbio sis. in press.

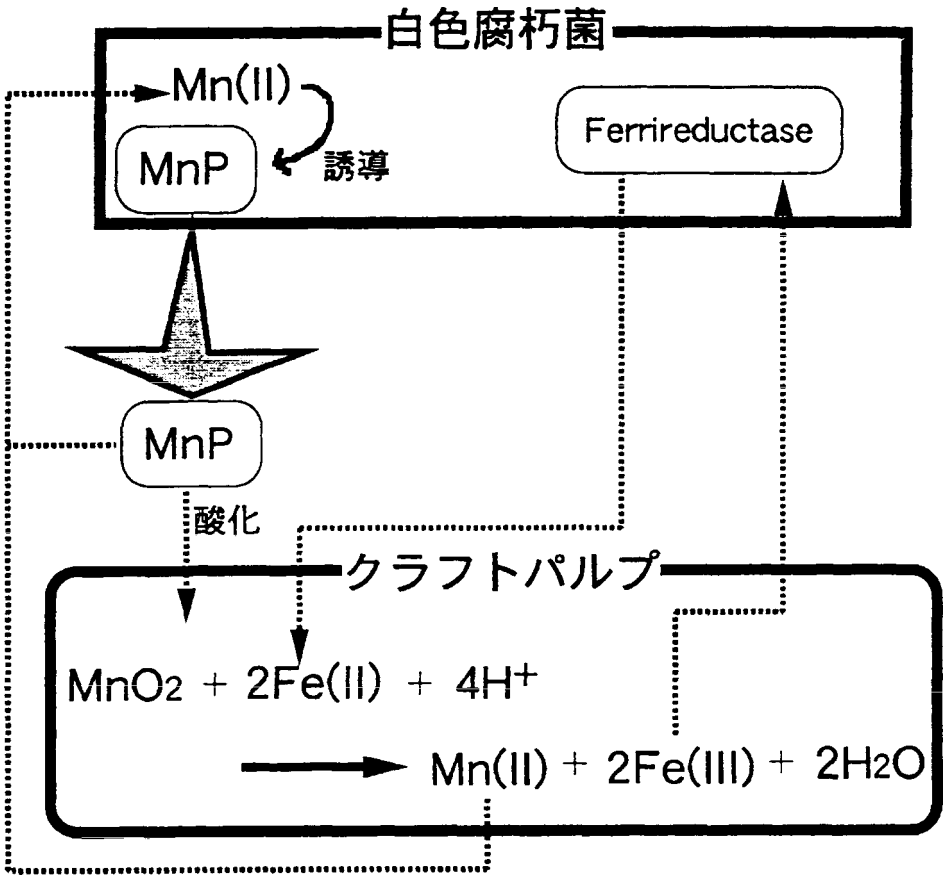
17) Kitade, O. and Matsumoto, T. : Cluster analysis on symbiotic protistan fauna of termites and a wood-feeding cockroach genus Cryptocercus. In: Endocytobiology V. Sato, S. Ishida, M. and Ishikawa, H. eds., Tubingen University Press, Tubinges, pp. 155-159. 1993.

18) Salas, J. A. and J. G. Hancock : Production of the perfect stage of Mycena citricolor (Berk. and Curt.) Sacc. Hilgardia 41: 213-234. 1972.

19) Urayama, T. : Preliminary note on the stimulative effect of certain specific bacteria upon fruit body formation in Psilocybe panaeoliformis Murrill : B ot. magazine (Tokyo) 70: 29-30. 1957.

20) Watanabe, T. : Stimulation of perithecium and ascospore production in Sordaria fimicola by Armillaria and vasrious fungal species : Mycol. Res. 101: 1190-1194. 1997.

21) Watanabe, T. : Sporidesmium filiferum from Tsukuba, Japan : Mycoscience 37: 367-369. 1996.



Scheme 1　白色腐朽菌によるクラフトパルプ漂白機構

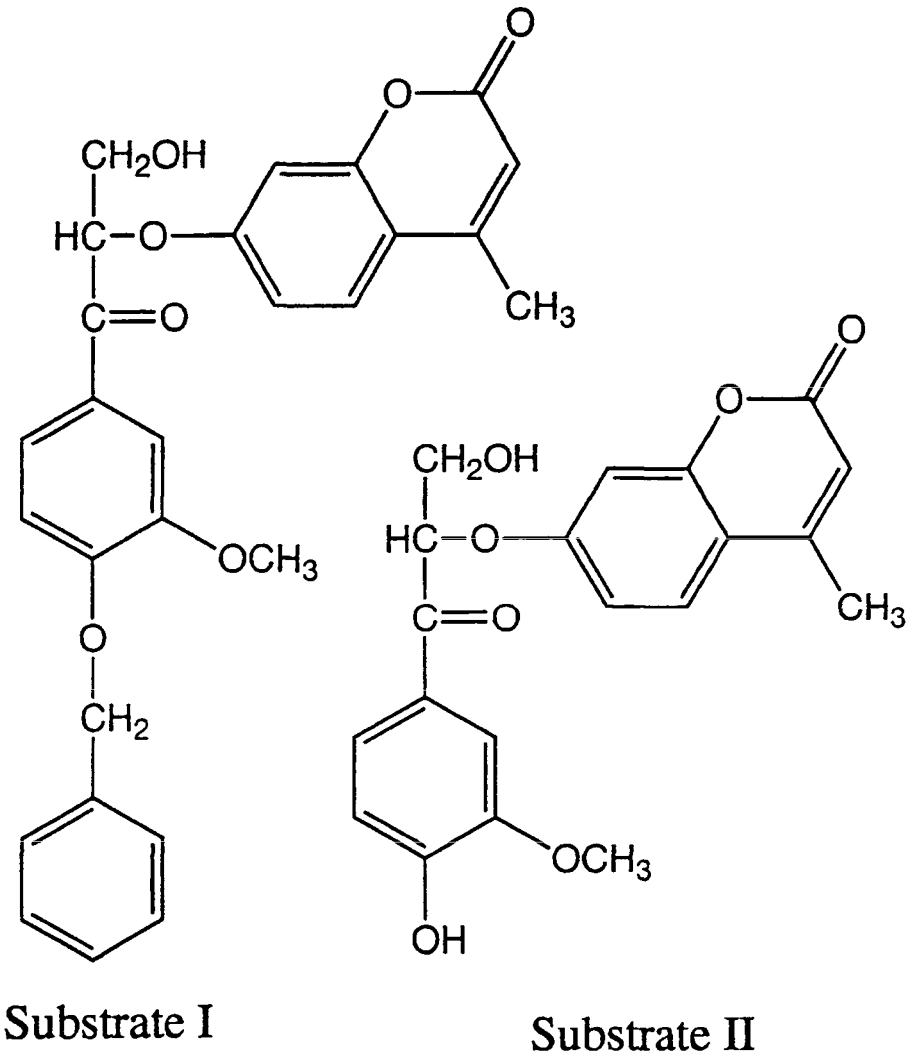


図1　実験に使用したβ-O-4型リグニンモデル化合物

DHP1mgを90%Dioxane100μL水溶液に溶解

↓

ガラス繊維濾紙（東洋濾紙製　GA-55、直径21mm）に含浸

↓

Dioxaneを蒸散

↓

PDA培地プレート上にDHP含浸濾紙を方置

↓

供試菌を濾紙上に接種

↓

28℃で二週間培養

↓

濾紙上の菌糸体を除去

↓

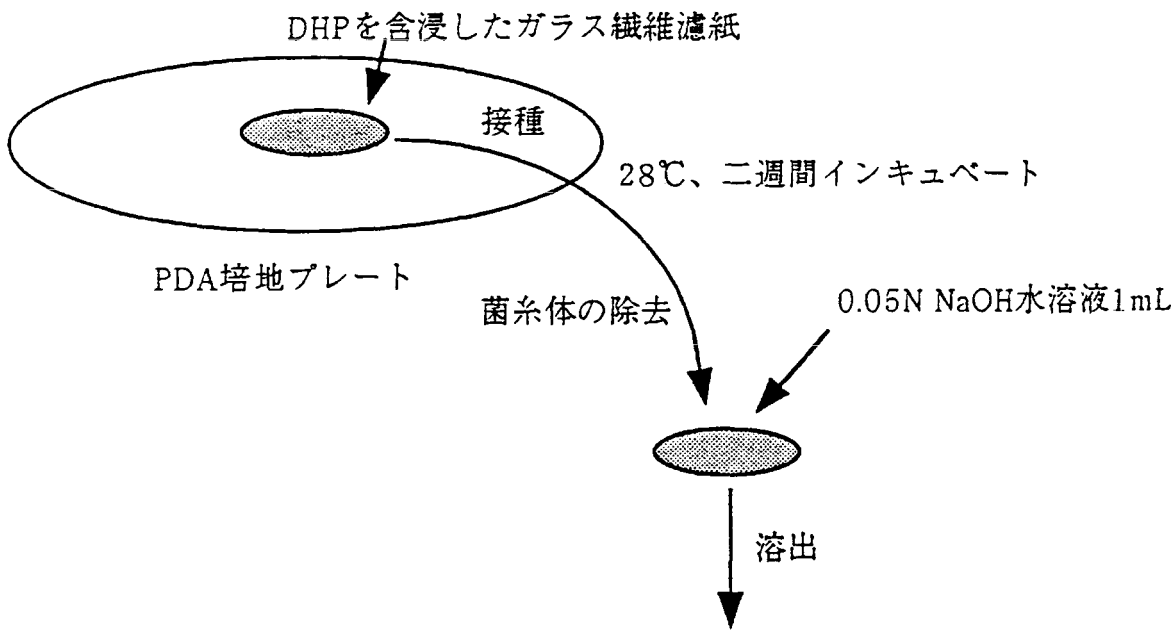
DHPの抽出

↓

0.05N NaOH水溶液1mL中に浸漬（室温、2時間）

↓

HPLC（東ソーTSKゲル　G3000PW-XL）、分光高度計　280nm



1-HPLC分析　280nm　DHPピーク面積よりDHP減少率を算出
2-分光高度計 280nm　腐朽前後の吸光度によりDHP減少率を算出

図2　DHP基質を用いた分解アッセイ法の検討

Solutions

Extraction buffer (TES)	100 ml
0.2 M Tris-Cl, pH 8.5	20 ml of 1 M Tris-Cl, pH 8.5
0.1 M EDTA, pH 8.5	20 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.5
0.25 M NaCl	5 ml of 5 M NaCl
1 % SDS	10 ml of 10 % SDS
5 M NaCl	
CTAB/NaCl	100 ml
CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)	10 g
NaCl	4.1 g
	dissolve at 65℃

Other Reagents Needed

Proteinase K

RNase A (10 mg/ml)

Culture filtrate

Freeze dried ground mycelia (0.25-0.35 g)

- 10 ml Extraction buffer
- Proteinase K 1.0 mg (0.1 mg /ml)
  - suspend
  - incubate at 37～50 ℃ overnight
- 1.8 ml 5 M NaCl
  - mix throughly and gently
- 1.5 ml CTAB/NaCl
  - mix throughly and gently
  - incubate at 65 ℃, 10～20 min
- Chloroform/isoamylalcohol
  - centrifuge for 1h (13000 g)
- RNase A (10 μ g/ml)
  - incubate at 4 ℃ overnight
- Phenol/Chloroform/isoamylalcohol (1 ～2 times)
  - centrifuge for 1h (13000 g)
- 0.6 vol isopropanol or 2 vol 99.5 % ethanol
  - incubate
  - centrifuge for 10 min (8000 rpm)
- 70 % ethanol
  - dry under vacuum
- 0.5～1.0 ml TE

Chr. DNA soln.

図３　糸状菌からの染色体 DNA の抽出

sense primer

DH (35 mer, 16 x)
5′ -CTC GAA GTC ATC CGT CTG ACC TTC CAC GAC GCC AT-3′
T T T T

NF (32 mer, 12 x)
5′ -GTC AAC AAC GCG GCG TGC TGC GCT TTC ATC CC-3′
C C T
A

antisense primer

PH (30 mer, 16 x)
5′ -GTC GAC CTT GTC CGC GCG CGC AAC AGT GTG-3′
T A G A

MR1 (30 mer, 8 x)

5′ -GGG CTT CGG CAC GGG GAC GAC GTC GCT GCA-3′
GG C

MR2 (36 mer, 12 x)

5′ -CGT GCG CTC GTC GCG CGC GAG CGC AAA GTC GGA CTG-3′
C G T
A

図4 manganese peroxidase の増幅に用いた Degenerative primer の配列

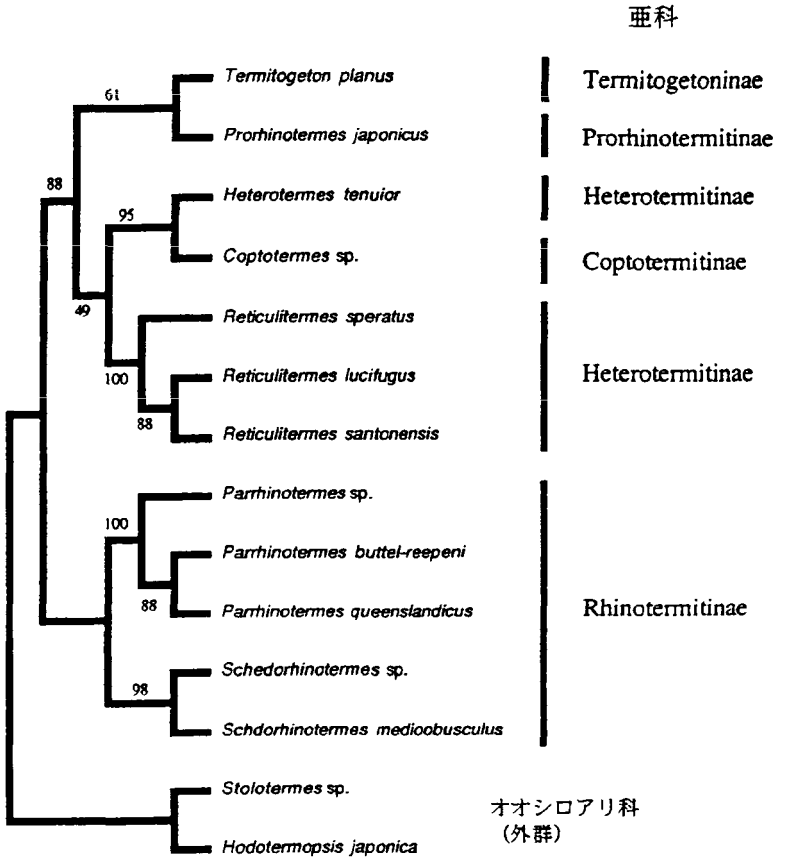


図5 COII 遺伝子の塩基配列から推定されたミゾガシラシロアリ科の系統関係
Note: 687bp, 数字はブートストラップ値（100回のリサンプリング）を示す

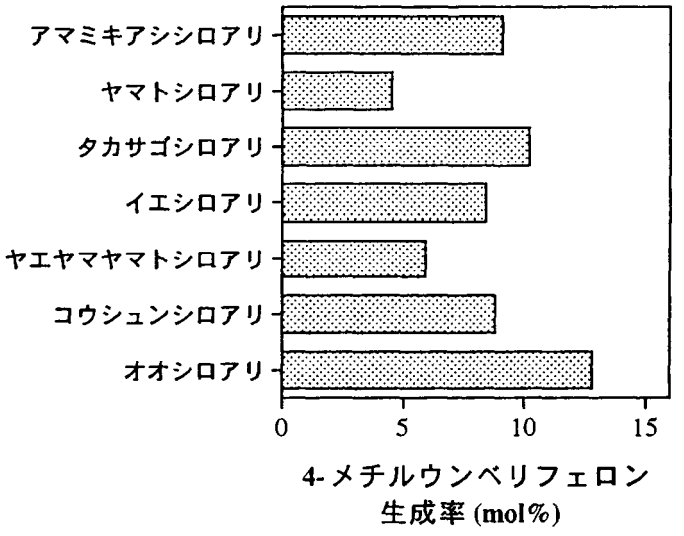


図6　各種シロアリによる Substrate Ⅰの分解

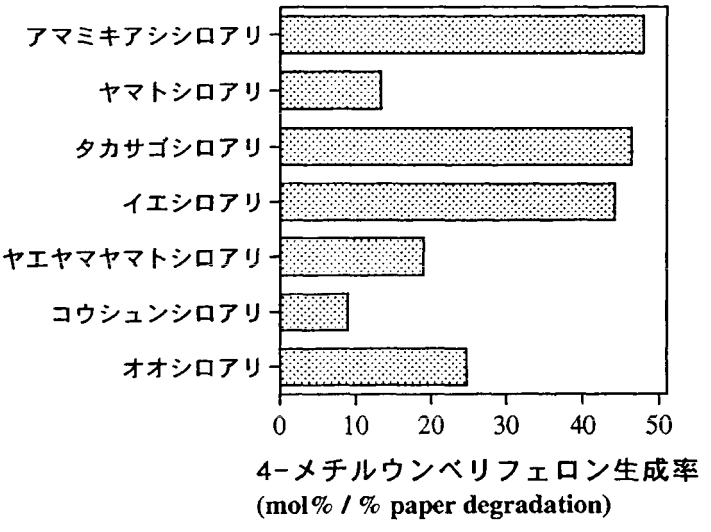


図7　パルプシート摂取率で補正したリグニンモデル化合物分解率

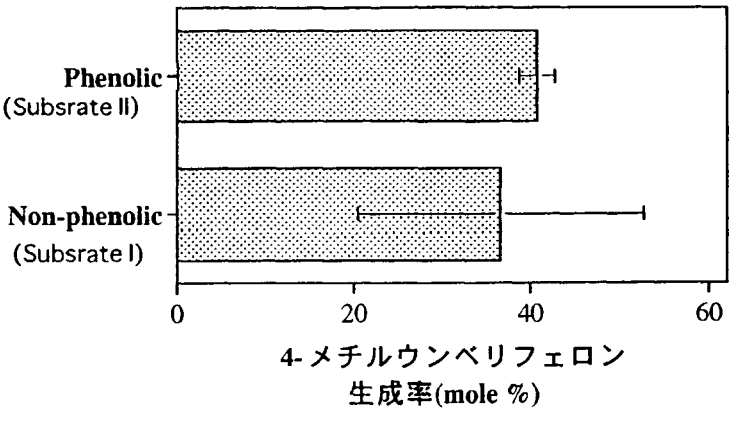


図8　オオシロアリによる β-O-4 型リグニンモデル化合物の分解における
フェノール性水酸基の影響

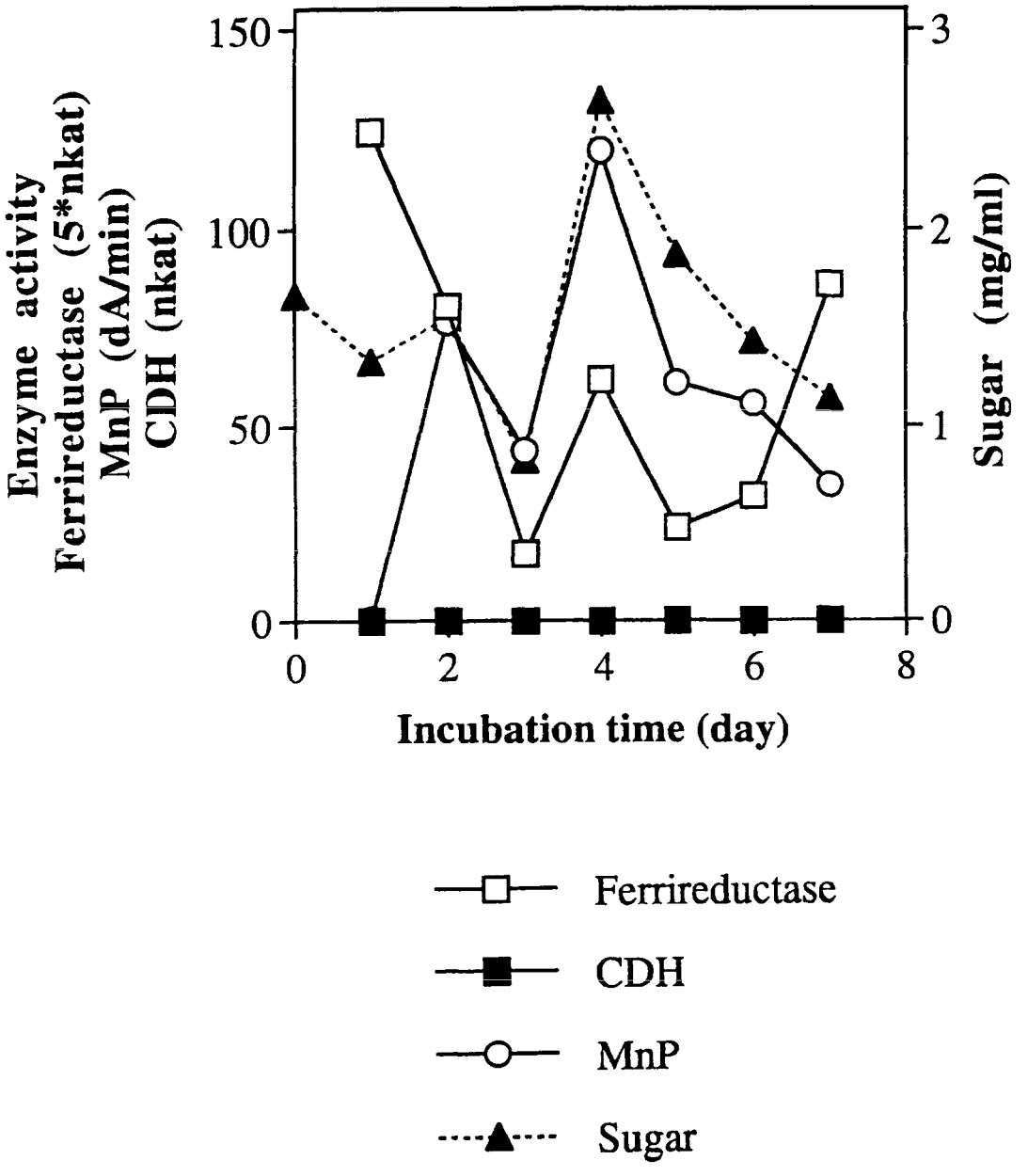


図9　*P. sordida* YK-624 株によるクラフトパルプ分解時に観察される酸化還元酵素活性

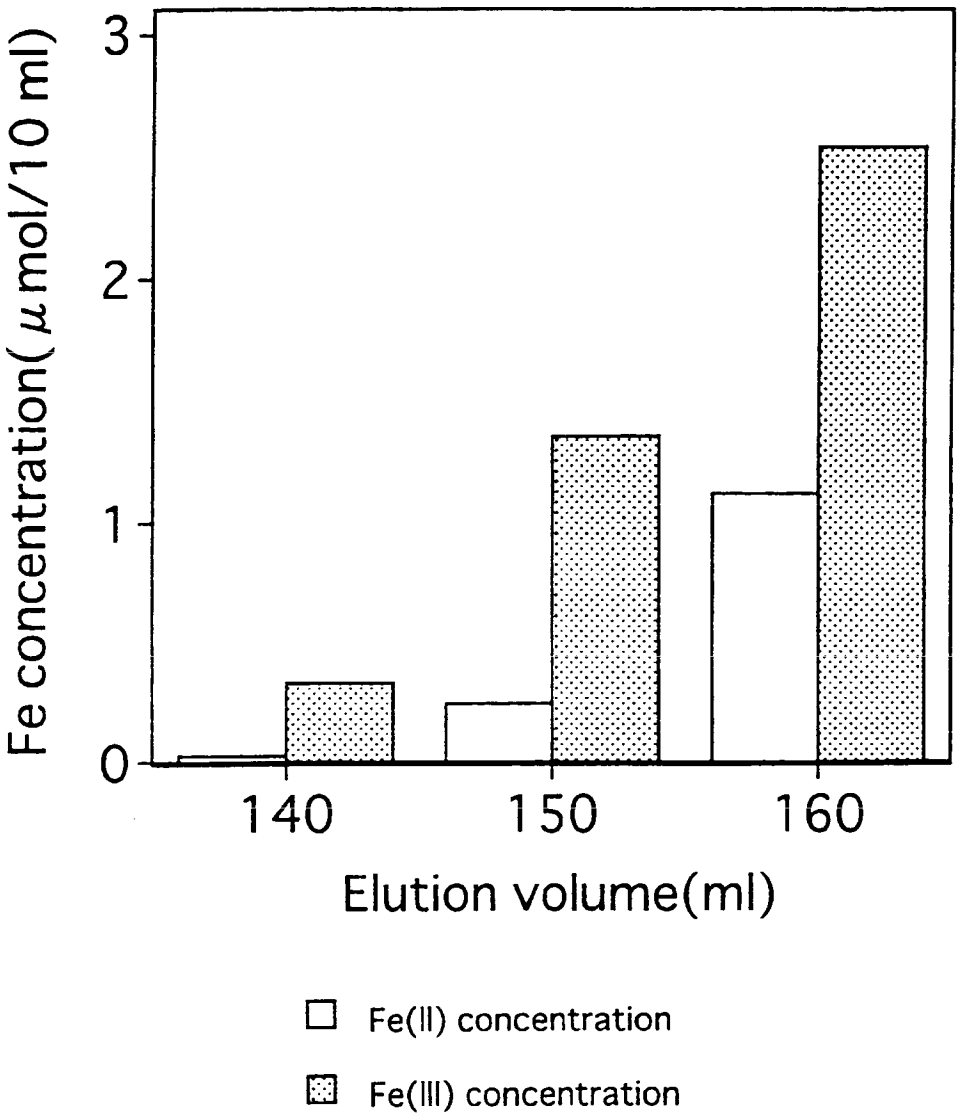


図10　Fe（II）もしくはFe（III）を添加したsiderophore様化合物のゲルろ過クロマトグラフィー

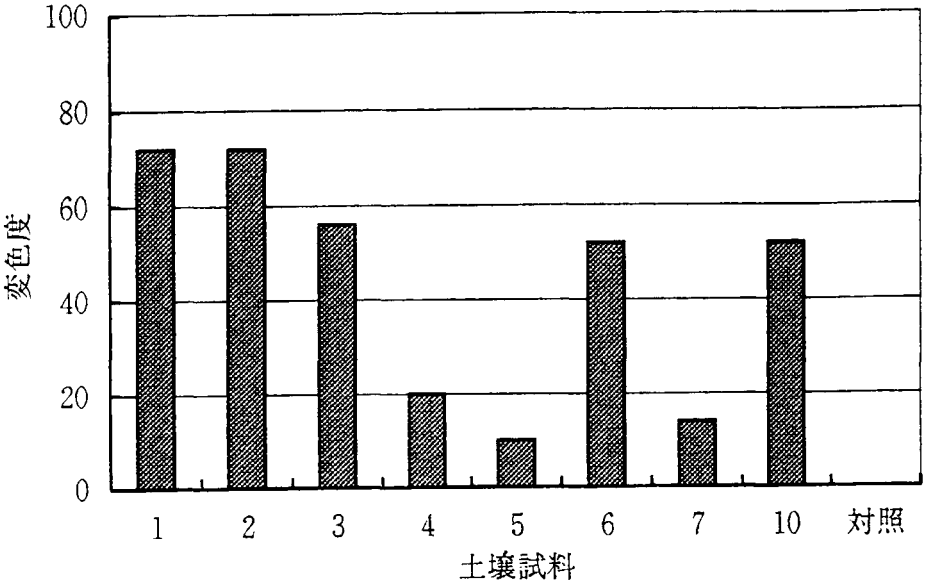


図13　自然土壌中の爪楊枝の変色度

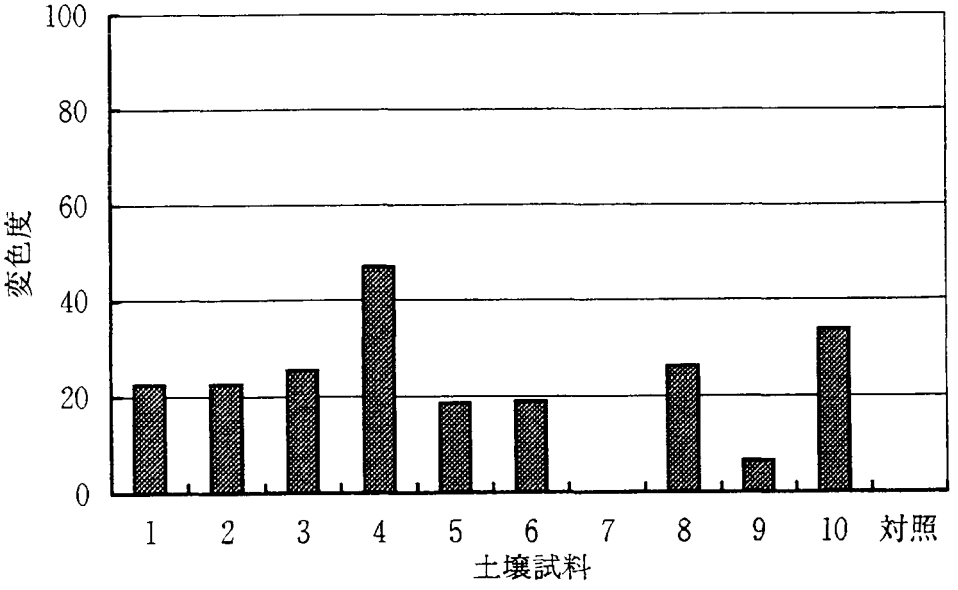


図14　土壌資料中の爪楊枝の変色度

表１　一飼育系に使用したシロアリの個体数

シロアリ	個体数
オオシロアリ	1
コウシュンシロアリ	4
ヤエヤマヤマトシロアリ	20
イエシロアリ	13
タカサゴシロアリ	10
ヤマトシロアリ	20
アマミキアシシロアリ	20

＊　シロアリは一飼育系に添加する生重量をそろえて添加した。

表２　実験に使用したシロアリの分類上の位置付け

- Mastotermitidae　ムカシシロアリ科
  - *Mastotermes*
- Hodotermitidae　シュウカクシロアリ科
  - *Anacanthotermes*
  - *Microhodotermes*
  - *Hodotermes*
- Termopsidae　オオシロアリ科
  - *Archotermopsis*
  - *Hodotermopsis* ―― *Hodotermopsis japonica* オオシロアリ
  - *Zootermopsis*
  - *Porotermes*
  - *Stolotermes*
- Kalotermitidae　レイビシロアリ科
  - *Cryptotermes*
  - *Procryptotermes*
  - *Epicalotermes*
  - *Bicornitermes*
  - *Bifiditermes*
  - *Proneotermes*
  - *Tauritermes*
  - *Allotermes*
  - *Marginitermes*
  - *Incisitermes*
  - *Pterotermes*
  - *Postelectrotermes*
  - *Neotermes* ―― *Neotermes koshunensis* コウシュンシロアリ
  - *Rugitermes*
  - *Eucryptotermes*
  - *Kalotermes*
  - *Paraneotermes*
  - *Ceratokalotermes*
  - *Comatermes*　カタンシロアリ
  - *Glyptotermes* ―― *Glyptotermes fuscus*
  - *Calcaritermes*
- Rhinotermitidae　ミゾガシラシロアリ科
  - *Stylotermes*
  - *Termitogeton*
  - *Glossotermes*
  - *Psammotermes*
  - *Reticulitermes* ―― *Reticulitermes speratus* ヤマトシロアリ; *Reticulitermes amamiensis* アマミキアシシロアリ; *Reticulitermes miyatakei* アマミシロアリ; *Reticulitermes yaeyamanus* ヤエヤマヤマトシロアリ
  - *Heterotermes*
  - *Coptotermes* ―― *Coptotermes formosanus* イエシロアリ
  - *Prorhinotermes*
  - *Parrhinotermes*
  - *Macrorhinotermes*
  - *Schedorhinotermes*
  - *Rhinotermes*
  - *Dolichorhinotermes*
  - *Acorhinotermes*
- Serritermitidae　ノコギリシロアリ科
  - *Serritermes*
- Termitidae　シロアリ科
  - Apicotermitinae　45 属
  - Termitinae　86 属
  - Macrotermitinae　13 属
  - Nasutitermitinae　81 属
    - *Nasutitermes* ―― *Nasutitermes takasagoensis* タカサゴシロアリ

表 3　DSM119M 培地（pH6.8）

KH_2PO_4	0.5g/l			
$MGCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2g/l			
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05g/l			
NaCl	0.4g/l			
NH_4Cl	0.6g/l			
$FeCl_2$	5mg/ml			
Trace mineral solition	1ml/l	$FeCl_2$	10mM	1270g/l
		$CoCl_2$	1mM	130g/l
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1mM	198g/l
		$ZnCl_2$	1mM	136g/l
		H_3BO_3	0.1mM	6.2g/l
		$NiCl_2$	0.1mM	13g/l
		$AlCl_3$	0.1mM	13.3g/l
		$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1mM	24.2g/l
		$CuCl_2$	0.01mM	1.3g/l
Vitamine solution	10ml/l	Biotin	20μM	4.88mg/l
		4-aminobenzoic acid	20μM	2.74mg/l
		Ca-pantothenate	20μM	9.54mg/l
		Pyridoxine HCl	20μM	4.12mg/l
		Nicotinamide	20μM	2.44mg/l
		Thiamine	20μM	6.74mg/l
		Thiotic acid	20μM	4.12mg/l
		Folic acid	20μM	8.82mg/l
		Vitamine B_{12}	20μM	27.1mg/l
		Riboflavin	20μM	7.52mg/l
Yeast extract	1g/l			
Polypeptone	1g/l			
$NaHCO_3$	3g/l			
Lignin*	1g/ml			
Resazurin solution*	1ml/ml			
$Na_2S \cdot 9H_2O$*	0.3g/l			
Cysteine·HCl*	0.3g/l			

Legend : *; only anaerobic condition

表4　LSV 培地（pH6.8）

Humic acid	1g/l		
Na_2HPO_4	0.5g/l		
KCl	1.7g/l		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/l		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g/l		
$CaCO_3$	0.02g/l		
Soy bean meal	0.2g/l		
B-vitamines solution	10ml/l	Thiamine-HCl	50mg/l
		Riboflavin	50mg/l
		Niacin	50mg/l
		Pyridoxine HCl	50mg/l
		Inositol	50mg/l
		Ca-pantothenate	50mg/l
		4-aminobenzoic acid	50mg/l
		Biotin	25mg/l
Lignin*	1g/ml		
Resazurin solution*	1ml/ml		
$Na_2S \cdot 9H_2O$*	0.3g/l		
Cysteine・HCl*	0.3g/l		

Legend : *; only anaerobic condition

表5　実験に使用したシロアリ

学名	和名	食塩水濃度(%)
Hodotermopsis japonica	オオシロアリ	0.6
Neotermes koshunensis	コウシュンシロアリ	0.6
Glyptotermes fuscus	カタンシロアリ	0.6
Reticulitermes speratus	ヤマトシロアリ	0.4
Reticulitermes yaeyamanus	ヤエヤマヤマトシロアリ	0.4
Coptotermes formosamus	イエシロアリ	0.4
Nasutitermes takasagoensis	タカサゴシロアリ	0.4

表6　南西諸島において採集した食材性昆虫類

分類群	種名	採取地
シロアリ目		
オオシロアリ科	オオシロアリ（*Hodotermopsis japonica*）	屋久・徳之島
レイビシロアリ科	カタンシロアリ（*Glyptptermes fuscus*）	徳之島・与那国島
	コウシュンシロアリ（*Neotermes koshunensis*）	西表島・与那国島
ミゾガシラシロアリ科	ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）	屋久島
	アマミキアシシロアリ（*R. amamiensis*）	徳之島
	アマミシロアリ（*R. miyatakei*）	徳之島
	ヤエヤマヤマトシロアリ（*R. yaeyamanus*）	西表島
	ヤエヤマヤマトシロアリ？（*R. sp.*）	与那国島
	イエシロアリ（*Coptotermes formosanus*）	屋久島・徳之島・西表島・与那国島
シロアリ科	タカサゴシロアリ（*Nasutitermes takasagoensis*）	西表島
ゴキブリ目		
オオゴキブリ科	オオゴキブリ（*Panesthia angustipennis*）	屋久島・西表島
	エサキクチキゴキブリ（*Salgane esakii*）	屋久島
	タイワンクチキゴキブリ（*Salgane taiwanensis*）	徳之島・西表島
コウチュウ目		
クワガタムシ科	ヒラタクワガタ	西表島

表7　オーストラリアおよび南アフリカで調査したシロアリ

Family	genus	species	locality	colony No.
ムカシシロアリ科				
	Mastotermes	*darwinensis*	Darwin, AU	22
オオシロアリ科				
	Porotermes	*adamsoni*	Wyong, AU	64
	Porotermes	*planiceps*	George, SA	12, 14
	Stolotermes	*victoriensis*	Wyong, AU	63
	Stolotermes	*africanus*	George, SA	1, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 13
シュウカクシロアリ科				
	Microhodotermes	*viator*	Bitterfontein, SA	21
レイビシロアリ科				
	Glyptotermes	sp.	Wyong, AU	56, 57
ミゾガシラシロアリ科				
	Coptotermes	*lacteus*（マウンド巣）	Wyong, AU	51, 52, 53
	Coptotermes	*acinaciformis* (?)/sp.	Wyong, AU	50, 60, 62
	Coptotermes	*acinaciformis*（マウンド巣）	Townsville, Darwin, AU	11, 23, 25, 46(?)
	Heterotermes	sp. 1	Townsville, AU	1, 5, 6
	Heterotermes	sp. 2	Darwin, AU	26, 37, 40, 42
	Heterotermes	sp. 3	Darwin, AU	38
	Heterotermes	sp. 4	Darwin, AU	27
	Psammotermes	*allocerus*	Nuwerus, SA	16, 20
	Schedorhinotermes	sp.	Townsville, AU	3, 15, 16
	Schedorhinotermes	sp.	Darwin, AU	47, 48
シロアリ科				
	Odontotermes	spp.	SA	2, 7
	Microcerotermes	spp.	AU	2, 12, 17, 20, 21, 24, 41, 43, 44, 49
	Microcerotermes	sp.	SA	23
	Nasutitermes	spp.		8, 18, 45, 61
	Tumulitermes (?)	spp.	AU	4, 13, 14, 31
	Trinervitermes	sp.	Springbok, SA	17, 19
	Gen. A (Nasutitermitinae)	sp.	Springbok, SA	18
	Amitermes	spp.	AU	32, 33,
		sp.	SA	8, 22
	Drepanotermes	sp.	AU	9
	Termes group	spp.	AU	19, 28, 29, 34, 35, 39

表8　調査した消化管内共生原生動物の組成
（各シロアリの保有する原生動物の属ごとの種類を示す）

	ミゾガシラシロアリ科												レジシロアリ科
	Heterotermes sp. 1 (Townsville, n=1)	*Heterotermes* sp. 2 (Darwin, n=1)	*Heterotermes* sp. 3 (Darwin, n=1)	*Heterotermes* sp. 4 (Darwin, n=4)	*Coptotermes acinaciformis* (mound, n=3)	*Coptotermes acinaciformis* (mound なし, n=2)	*Coptotermes lacteus* (mound, n=3)	*Psammotermes allocerus* (near Springbok)	*Parrhinotermes* sp. 1 (Seplilok)	*Parrhinotermes* sp. 2 (Gunun Emas)	*Parrhinotermes* sp. 3 (Tambunan)	*Schedorhinotermes* sp. (Darwin, n=2)	*Glyptotermes* sp. (Wyong, n=2)
symbiont genera													
超鞭毛虫目													
Trichonympha	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Pseudotrichonympha	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	–
Holomastigotoides	1	1	1	2?	1	1	1	1	–	–	–	–	–
Spirotrichonympha	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	2	–
Microjoenia	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–
トリコモナス目													
Trichomonas	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1	–
Hexamastix	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1	1
Tricercomitus	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Macrotrichomonas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Hyperdevescovina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Foaina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Tricercomitus	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
オキシモナス目													
Oxymonas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1?

表9　シロアリ類の飼育予備実験

Note：○；生残率が90%以上のもの
Legend：W；職蟻（擬職蟻），S；兵蟻

	餌	導入個体数	3 wk	(5wk)
オオシロアリ	濾紙	10W	○	○
	セルロース粉	5W	○	○
	セルロース粉	10W	○	○
イエシロアリ	セルロース粉	10W	死滅	-
	セルロース粉	20W	○	5
コウシュンシロアリ	濾紙	10W	○	5
	セルロース粉	5W	○	○
	セルロース粉	10W	○	○
カタンシロアリ	濾紙	5W	○	4*
	セルロース粉	8W 1S	○	○
タカサゴシロアリ	濾紙	20W	○	6
	濾紙	40W	○	28
	セルロース粉	20W	○	死滅
タイワンクチキゴキブリ	セルロース粉	1A	○	-
	セルロース粉	1A	○	-

*：うち3個体ででは有翅虫へのカスト分化が見られた。

表10　好気培養におけるイエシロアリ腸内細菌によるリグニンモデル化合物の分解

培地	蛍光強度	
	37 ℃培養	25 ℃培養
1	±	±
2	+	+
3	+	+
4	++	+
5	±	±
6	±	±
7	+	±

1. シロアリ抽出液のみ
2. DSMのみ
3. DSM+シロアリ抽出液
4. DSM+ルーメン液
5. LSVのみ
6. LSV+シロアリ抽出液
7. LSV+ルーメン液

表11　各種シロアリ腸内細菌によるリグニンモデル化合物の分解

シロアリ	増殖		蛍光強度	
	ルーメン＋	ルーメン－	ルーメン＋	ルーメン－
オオシロアリ	＋＋	＋	＋＋	±
コウシュンシロアリ	±	±	＋	±
カタンシロアリ	±	±	＋	±
ヤマトシロアリ	＋＋	＋	＋＋	＋
ヤエヤマヤマトシロアリ	＋＋	＋	＋＋	＋
イエシロアリ	＋＋	＋	＋＋	±
タカサゴシロアリ	±	±	＋	±

表12　実験に使用したシロアリ以外の食材性昆虫

昆虫名	個体重(g)	腸重量(g)	液量(ml)	濃度(個体重 mg/液量 ml)
オオゴキブリ	2.90	0.74(25.5%)	14.50	200
タイワンクチキゴキブリ	0.31	0.13(41.9%)	1.55	200
クワガタムシの幼虫	2.53	0.47(18.6%)	12.65	200
カミキリムシの幼虫	0.51	0.08(15.7%)	2.55	200
ワラジムシ	0.30	0.06(20.0%)	1.50	200

表13　シロアリ以外の食材性昆虫の腸内細菌によるリグニンモデル化合物の分解

昆虫名	蛍光強度	
	ルーメン液＋	ルーメン液－
コントロール	±	±
オオゴキブリ *Panesthia angustipennis*（屋久島）	＋	±
タイワンクチキゴキブリ *Salganea taiwanensis*（徳之島）	＋＋	＋
クワガタムシの幼虫（西表島）	±	±
カミキリムシの幼虫（つくば）	＋	±
ワラジムシ（つくば）	±	±

表14　保存株の DHP 溶出率

菌株No.	保存No.	学名	和名	DHP溶出率(%)
1	F1230	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	17.2
2	F1231	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	14.9
3	F1232	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	10.7
4	F1233	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	11.2
5	F1234	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	12.6
6	F1235	Pleuroteus cystidiosus	オオヒラタケ	2.5
7	F1236	Pleuroteus pulmonarius	ウスヒラタケ	24.3
8	F1249	Pleuroteus salmoneostramineu	トキイロヒラタケ	16.8
9	F1252	Rhodophyllus crassipes	ウラベニホテイシメジ	-12.8
10	F1265	Coriolus versicolor	カワラタケ	25.8
11	F1280	Coriolus versicolor	カワラタケ	18.1
12	F1286	Coriolus hirsutus	アラゲカワラタケ	21.7
13	F1291	Pleuroteus sp.	ヒラタケ	21.4
14	F1293	Pleuroteus sp.	ヒラタケ	33.5
15	F1294	Pleuroteus ostrateus	ヒラタケ	35.6
16	F1302	Coriolus versicolor	カワラタケ	3.7
17	F1312	Pleuroteus pulmonarius	ウスヒラタケ	14.6
18	F1332	Lyophyllum decastes	ハタケシメジ	-7.1
19	F1333	Coriolus versicolor	カワラタケ	17.4
20	F1259	Tricholoma psammopus	キビダマツシメジ	0.9
21	F1701	Trichoderma viride		-0.9
22	F1702	Trichoderma viride		-1.7
23	F1403	Phanerochaete chrysosporium		20.2

表15　爪楊枝とろ紙による捕捉法を用いたつくば産の土壌糸状菌

	1				2				3				4				5				合計	
	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	F
菌名																						
Absidia	1																				1	0
Chaetomium X4			1																		0	1
Cunninghamella	3				1				2							1					6	1
Cylindrocarpon												1									0	1
Cylind. X14														1							0	1
Fusarium																					0	0
F. oxysporum	3		2	3				1	1		3	2							1		4	12
F. r.																		1			0	1
F. s.																		2		1	0	3
Gliocladium						1	2	2					1	1		1					1	7
G. penicilloides							1														0	1
Humicola					1	4		1					2		1						3	6
Monacrosporium	1	5	3	1	1	1		1				1					2	3	6	6	4	27
Mortierella				1		1								3		1					0	6
Penicillium																1				2	0	3
Pythium																					0	0
Rhizoctonia																					0	0
R. solani(b)																					0	0
R. fragariae																					0	0
R. (cream)																					0	0
R. (white)			1	1					2	8			4	1							6	11
Rhizopus					1																1	0
Trichoderma						1		2				1									0	4
Verticillium						2	2														0	4
X2				2																	0	2
X3			1																		0	1
X5				1																	0	1
X6		1																			0	1
X7								1													0	1
X8								1													0	1
X9												1									0	1
X10												1									0	1
X11										1											0	1
X12																1	1				1	1
X13																1					0	1
X15																2					0	2
X16																1					0	1
X17																		1			0	1
X18																	2				2	0
X19																	3				3	0

表15　爪楊枝とろ紙による捕捉法を用いたつくば産の土壌糸状菌（続き）

	6				7				8				9				10				合計	
	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	S	R	-	T	F
菌名																						
Absidia																					0	0
Chaeto. X28													1								1	0
Cunninghamella	6	1							12				3				1				22	1
Cylindrocarpon					1			1							1						1	2
Fusarium																					0	0
F. oxysporum	2	2	1			2	1					1		1					2	1	2	11
F. r.																					0	0
F. s.						1	4	2				1									0	8
Gliocladium	1															3					1	3
G. penicilloides																					0	0
Humicola		1	3	3																	0	7
Monacrosporium																	7	3	2	5	7	10
Mortierella		5												2	1	1					0	9
Paecilomyces															1	1					0	2
Penlcillium								3				1									0	4
Pythium					2	1		1													2	2
Rhizoctonia																					0	0
R. solani(b)								1								1					0	2
R. fragariae																					0	0
R. (cream)										2	2	5									0	9
R. (white)													1			1	4	3			5	4
Rhizopus																					0	0
Trichoderma				1																1	0	2
Verticillium												1			1	2					0	4
X20		1																			0	1
X21				1																	0	1
X22		2		1																	0	3
X23						1		1													0	2
X24												1									0	1
X25												1									0	1
X24																1					0	1
X25															1						0	1
X26															1						0	1
X27															1						0	1
X29																1					0	1
X30																				1	0	1

T：爪楊枝による分離株

F：ろ紙の3種（S，R，－）による分離株

表16　ヤマトシロアリ（つくば）から分離された糸状菌

1. 22℃での分離

a.工技院東側

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Arthrinium* sp.	-
2	-	-
3	*Arthrinium* sp.	*Arthrinium* sp.
4	*Humicola* sp.	-
5	*Humicola* sp.	-
6	*Cladosporium* sp.	-
7	*Trichoderma* sp.No.1	-
8	*Humicola* sp.	*Chaetomium* sp.
9	-	-
10	*Trichoderma* sp.No.2	-
11	*Arthrinium* sp.	-
12	*Penicillium* sp.	-
13	*Arthrinium* sp.	-
14	*Arthrinium* sp.	-
15	*Arthrinium* sp.	-
16	*Trichoderma* sp.No.3	*Arthrinium* sp.
17	*Trichoderma* sp.No.4	*Arthrinium* sp.
18	-	*Arthrinium* sp.

b.工技院北側中央部

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Mucor* sp.	*Mortierella* sp.
2	*Acremonium* sp.No.1	-
3	-	-
4	*Cunninghamella* sp.	*Humicola* sp.
5	*Acremonium* sp.No.1	*Mucor* sp.
6	*Penicillium* sp.	-
7	*Trichoderma* sp.No.1	-
8	*Cunninghamella* sp.	-
9	*Trichoderma* sp.No.2	-
10	*Trichoderma* sp.No.3	-

2. 10℃での分離

a.工技院東側

17匹中5匹から分離できた。

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Cladosporium* sp.	-
2	*Arthrinium* sp.	-
3	*Arthrinium* sp.	-
4	*Arthrinium* sp.	-
5	-	*Arthrinium* sp.

b.工技院北側中央部

10匹中6匹から分離できた。

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Acremonium* sp.No.2	*Acremonium* sp.No.2
2	-	*Acremonium* sp.No.2
3	*Trichoderma* sp.No.1	-
4	*Penicillium* sp.	-
5	-	*Trichoderma* sp.No.2
6	-	*Penicillium* sp.

表17　ヤマトシロアリの生息環境（つくば）からの菌分離

1. 22℃での分離

a.工技院東側

Trichoderma sp.No.1	11 株	25株
Trichoderma sp.No.2	13 株	
Trichoderma sp.No.3	1 株	
Mortierella sp.	13 株	
Fusarium sp.	1 株	

b.工技院北側中央部

Trichoderma sp.No.1	18 株	22株
Trichoderma sp.No.2	2 株	
Trichoderma sp.No.3	2 株	
Gliocladium sp.	19 株	
?	1 株	

2. 10℃での分離

a.工技院東側

Trichoderma sp.No.1	1 株	12株
Trichoderma sp.No.2	8 株	
Trichoderma sp.No.3	2 株	
Trichoderma sp.No.4	1 株	
Mortierella sp.	49 株	
Sclerotium sp.	10 株	
Mucor sp.	4 株	
Cylindrocarpon sp.	2 株	
Penicillium sp.	1 株	
?	1 株	

b.工技院北側中央部

Trichoderma sp.No.1	4 株
Mortierella sp.	21 株
Cylindrocarpon sp.	2 株
Cladosporium sp.	1 株
?	1 株

表18　ヤマトシロアリ（屋久島）から分離された糸状菌

1. 22℃での分離

20匹中15匹から分離できた。

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
2	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
3	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
4	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
5	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
6	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
7	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
8	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
9	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
10	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
11	*Cunninghamella* sp.	*Trichoderma* sp.
12	*Cunninghamella* sp.	−
13	*Cunninghamella* sp.	−
14	*Cunninghamella* sp.	−
15	*Cunninghamella* sp.	−

2. 10℃での分離

20匹中14匹から分離できた。

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
2	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
3	*Mortierella* sp.	*Mortierella* sp.
4	*Mortierella* sp.	−
5	*Mortierella* sp.	−
6	*Mortierella* sp.	−
7	*Mortierella* sp.	−
8	*Mortierella* sp.	−
9	*Mortierella* sp.	−
10	*Mortierella* sp.	−
11	*Mortierella* sp.	−
12	*Mortierella* sp.	−
13	*Mucor* sp.	−
14	*Mucor* sp.	−

表19　ヤマトシロアリの生息環境（屋久島）から分離された糸状菌

1. 22℃での分離

Trichoderma sp.No.1	17 株	25株
Trichoderma sp.No.2	6 株	
Trichoderma sp.No.3	2 株	
Mortierella sp.No.1	15 株	24株
Mortierella sp.No.2	9 株	
Gliocladium sp.	5	
Cunninghamella sp.	1	
Mucor sp.	1	

2. 10℃での分離

Mortierella sp.No.1	35 株	46株
Mortierella sp.No.2	11 株	
Mucor sp.	1 株	

表20　オオシロアリ（屋久島）から分離された寄生菌類

1. 22℃での分離

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Arthrinium* sp.	*Penicillium* sp.No.1
2	*Penicillium* sp.No.2	*Penicillium* sp.No.1
3	*Penicillium* sp.No.1	*Penicillium* sp.No.1
4	*Mucor* sp.	*Trichoderma* sp.
5	*Penicillium* sp.No.2	*Penicillium* sp.No.2
6	*Penicillium* sp.No.1	*Mucor* sp.
7	*Trichoderma* sp.	*Penicillium* sp.No.1
8	*Mucor* sp.	*Penicillium* sp.No.1
9	*Penicillium* sp.No.1	*Penicillium* sp.No.1

2. 10℃での分離

9匹中2匹から分離できた。

Termite No.	分離部位	
	胴	頭
1	*Penicillium* sp.No.2	-
2	-	*Mucor* sp.

表21　オオシロアリの生息環境（屋久島）からの菌分離

1. 22℃での分離

Trichoderma sp.No.1	3 株	33株
Trichoderma sp.No.2	1 株	
Trichoderma sp.No.3	7 株	
Trichoderma sp.No.4	10	
Trichoderma sp.No.5	12	
Mortierella sp.No.1	3 株	6株
Mortierella sp.No.2	3 株	
Gliocladium sp.	4	3株
Penicillium sp.No.1	1	
Penicillium sp.No.2	2	

2. 10℃での分離

Mortierella sp.No.2	32 株	41株
Mortierella sp.No.3	9 株	
Mucor sp.	1 株	
Penicillium sp.No.1	1 株	

[再委託研究]

1. シロアリなどの食材性昆虫の体内微生物研究（東京大学教養学部　松本忠夫教授）

1.1 緒　　言

1.1.1 研究の背景や経緯

熱帯域には膨大な種数の昆虫類が生息している。その種数は数百万種とも数千万種ともいわれている。歩行型の社会性昆虫であるシロアリ類とアリ類は、種類数はそれぞれ約2200種、約1万種と飛び抜けたものではないが、それらの現存量は動物の中でも最大級であり、生態系の中で重要な位置を占めている[1]。

これらの歩行型の社会性昆虫は、他の生物と共生関係にあるものが多い。たとえば、枯死植物を基質として菌類を栽培し、それを食物として生計を成り立たせているものがいる。中でも東南アジアのキノコシロアリ類や、南米のハキリアリ類は熱帯林において大繁栄をしている。また、東南アジアにおいては、菌類とシアノバクテリアの共生生物である地衣類を専門食としているコウグンシロアリや[2]、土壌中の菌類や菌根に栄養的に依存している多数の土壌食シロアリが生息している。このように、シロアリ・植物・菌類そして細菌は、複雑な複合生物系を形成している[3]。

上に述べたものは、細胞外の共生系の例であるが、シロアリ類もアリ類も、細胞内に共生細菌を持っている種類が知られている。アリ類では、ヤマアリ亜科のオオアリ族、ヤマアリ属、ヒメキアリ属などである。このうちオオアリ族では、ほとんどの種で共生細菌を中腸に保有していることが知られている[4]。ヤマアリ属では一部の種のみで見られ、コロニーごとにその存在がまちまちな種もある。またオオアリ族では、細菌が生息している菌細胞は中腸上皮内に位置し、ヤマアリ属、ヒメキアリ属では、菌細胞は中腸の外周に位置している。これらの共生細菌はいずれもグラム陰性桿菌である。

オオアリ族とヤマアリ属-ヒメキアリ属の間にはいくつかの相違点があるが、両者とも宿主の系統が近縁であること、経卵感染すること、オオアリ族のある属ではヤマアリ属-ヒメキアリ属型に近い形態の共生細菌を持つことなどから、ヤマアリ亜科共生細菌が単一起源であるとする者もある。なお、これらの共生菌の役割については、未だに判然としていないが、宿主であるアリ類の栄養獲得に貢献している可能性が高い。

1.1.2 本研究の目的、本年度の目標

これらの社会性昆虫が、菌類をどのような物質でコントロールして栽培しているのか、また、菌類に含まれているどのような物質を栄養物として利用しているのか、あるいは細胞内の共生細菌が昆虫の代謝機能中でどのように関与しているか、などは未だにほとんど解明されていない。その理由はシロアリ類およびアリ類との共生関係にある菌類および細菌の大多数は分離・培養がなされていないからである。

そこで、本研究では、現場での昆虫類と菌類および細菌の共生関係の実態を調査するとともに、これらの菌類および細菌のDNAを取り出してその分子系統学的な解析を行う。

さらには菌類の培養を試み、代謝産物の検索を行う予定ある。

ところで、キノコシロアリ類が栽培する菌類のオオシロアリタケ（*Termitomyces*）は[5]、シイタケやマツタケ等と同じ担子菌類に属していて、タイでは特定に季節に地表に出現するその子実体を美味ということで好んで食用にしている。このような点から、これらの菌類とシロアリ等の共生関係の解明のための技術は、将来の産業にとって有用な知見が得られる可能性があり、その技術開発が強く望まれている。

そこで、本年度は、沖縄に分布するタイワンシロアリとオオシロアリタケの利用技術開発のため、分布調査、採集法の検討、培養のための生息環境の調査、菌からの DNA 抽出法の検討をした。

一方、アリに関しては、本年度は特に菌細胞内に共生細菌を持つことが知られているヤマアリ亜科のうち 5 属 16 種から、その共生細菌の 16SrRNA をコードする DNA の塩基配列を決定し、これら共生細菌を同定し、その系統を解析した。 またヤマアリ亜科の系統と共生細菌の系統を比較し、その関係を考察することを試みた。

1.2 実　　験

1.2.1 シロアリと菌類の関係

日本における唯一の熱帯域である沖縄県および東南アジアのボルネオ島などの熱帯林に出かけ、自然環境下での試料採取を行った。

沖縄県の西表島で採取された種は次のものである。

タイワンシロアリ（*Odontotermes formosanus*）

また、ボルネオ島で採取された種は次のものである。

ギルバスオオシロアリ（*Macrotermes gilvus*）

自然環境からの試料から 16S および 18SrRNA 遺伝子などの遺伝情報物質を効率的に回収し、遺伝子分子サイズや定量性等の状態解析の適性化を図るため、対象とする試料（菌体、土壌、動物組織、菌根）に含まれる不純物の特性を考慮した抽出・精製手法の開発ならびに定量的な電気泳動解析に基づく遺伝子状態解析手法の開発を行った。

1.2.2 アリと腸内共生細菌の関係

オオアリ族の *Camponotus quadrinotatos* の有翅虫から中腸と卵巣を摘出し、それぞれから DNA を抽出し PCR template とした。PCR に用いたプライマーは真正細菌の 16SrRNA 遺伝子（全長約 1500bp）の 800bp から 1400bp までの約 600bp を増幅するよう設計されている。PCR 反応の結果、いずれも期待される長さの明瞭なシングルバンドを得た。

PCR 産物は、プラスミド UC18 をベクターに用い、*Escherichica coli*（DH5）に導入し、クローニングを行った。中腸 DNA を template とした PCR 産物から 8 クローン、卵巣 DNA を template とした PCR 産物から 6 クローンのシークエンスを行い塩基配列を決定した結果、14 クローン中の 11 クローンは同一配列であった。残りの 3 クローンも 1-2 塩基が異なるのみであり、増幅された DNA はすべて同一配列であったと考えられる。

また *Plagiolepsis pigmaea* でも同様に中腸 DNA を template とした PCR 産物から 6 クローン、卵巣 DNA を template とした PCR 産物から 6 クローンのシークエンスを行った結果、PCR 産物はすべて同一配列であった。

Camponotus quadrinotatos、*Plagiolepsis pigmaea* とも PCR 産物を直接シークエンスした場合でも同一配列が得られたので以後オオアリ属 6 種、ヒラズオオアリ属 1 種、トゲアリ属 5 種、ヤマアリ属 1 種、ヒメキアリ属 1 種の 16SrRNA 遺伝子の塩基配列はダイレクトシークエンスで決定した。

1.3 結果および考察

1.3.1 シロアリと菌類の関係

沖縄県の西表島において、平成 9 年 6 月に 5 ヶ所においてシロアリタケの子実体群落を発見した。そのうち、2 ヶ所の地中を掘ったところ、タイワンシロアリの菌園が存在していた。採取した菌園の一部、虫体はアセトン中に保存してある。

マレーシアのサバ州において、平成 9 年 9 月に現地調査を行った。ラナウ付近においてギルバスオオシロアリの蟻塚を掘り、その中の菌園を採取することができた。採取した菌園の一部、虫体はアセトン中に保存してある。

16S および 18SrRNA 遺伝子などの遺伝情報物質を効率的に回収し、遺伝子分子サイズや定量性等の状態解析の適性化を図るため、対象とする試料（菌体、虫体、菌根）に含まれる不純物の特性を考慮した抽出・精製手法の開発ならびに定量的な電気泳動解析にもとずく遺伝子状態解析手法の開発を行ったが、今年度は明瞭な結果が得られず、課題は来年度に持ち越された。

なお、従前の調査時に採取し研究室に保存されている DNA 資料から COⅡ の分析を行い、キノコシロアリ亜科の系統的な位置を推定したところ、従前の形態に基づく系統図と一致した。

1.3.2 アリと腸内共生細菌の関係

ヤマアリ亜科共生細菌間で 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を比較した結果、属内の相同性はオオアリ属 7 種間、トゲアリ属 5 種間では 95% 以上、ヒメキアリ属 2 種間では 98.6% であった。また属間の相同性はオオアリ族内で 92〜93%、ヤマアリ属－ヒメキアリ属間では 95.6% だがオオアリ族 3 属とヤマアリ属－ヒメキアリ属との間では 91.6〜89.6% となった。これらの数値はそれほど明瞭ではないが形態的特徴から考えられているヤマアリ亜科の共生細菌の関係に合致する。

Genbank データベースを利用してヤマアリ亜科共生細菌の 16SrRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索を試みたところこれらが *Proteobactria* グループの腸内細菌科に近縁であることが解った。

腸内細菌科には幾つかの昆虫共生細菌が含まれており、これらと他の腸内細菌科の自由生活細菌と併せて系統解析を行った。系統樹は近隣結合法で作成した。（図 1）

その結果ヤマアリ亜科共生細菌が腸内細菌科に属し、少なくとも 2 つの系統に分かれる

ことが示された。オオアリ族の3属 オオアリ属、ヒラズオオアリ属、トゲアリ属共生細菌は単系統を形成したが、ヤマアリ亜科共生細菌のみで単系統とはならなかった。さらに形態的にはごく近縁と考えられていたヤマアリ属－ヒメキアリ属も単系統とはならなかった。しかしヤマアリ属に関してはダイレクトシークエンスのデータ1例のみであり、これがほんとうに共生細菌のものである確度は他の4属に比べ低い。

オオアリ族の3属の共生細菌は腸内細菌科の中では比較的早い時期に分岐したと考えられる。

共生細菌16SrRNA遺伝子塩基配列を決定した16種のうち10種の宿主アリのCOⅡをコードするミトコンドリアDNA974bpの塩基配列を決定し、このうち第一コドン、第二コドン650bpから近隣結合法による系統樹を作成した。(図2)

なお、*Camponotus japonicus, Colobopsis nipponicus, Plagiolepsis pigmaea, Formica fusca, Oecophira smaradgiua*のシークエンスデータについては北海道大学農学部の長谷川氏の未発表データを引用させていただいた。

オオアリ属、トゲアリ属の2属内では共生細菌の系統と宿主の系統は一致したが、オオアリの3属内でみると、共生細菌の系統ではトゲアリ属－ヒラズオオアリ属が近縁となるが、宿主の系統ではオオアリ属－トゲアリ属が近縁となる。しかしヒラズオオアリ属は1種しかデータがないので、その位置についてはさらに検討が必要である。

全体としてはオオアリ族では共生細菌の系統と宿主の系統はよく一致しており、共生細菌と宿主の共進化が示唆される。ヤマアリ属－ヒメキアリ属は宿主においても単系統とはならず、ここからもヤマアリ属、ヒメキアリ属の共生細菌が、別起源であることが示唆される。

1.4 結　　語

1.4.1 シロアリと菌類の関係

本年度の研究では、16Sおよび18SrRNA遺伝子などの遺伝情報物質を回収し、遺伝子分子サイズや定量性等の状態解析の適性化を図るため、対象とする試料（菌体、虫体、菌根）に含まれる不純物の特性を考慮した抽出・精製手法の開発を試みた。また、定量的な電気泳動解析に基づく遺伝子状態の解析手法の開発も行った。しかし、今年度は明瞭な結果が得られず、課題は来年度に持ち越された。来年度はサンプルの保存、抽出の方法、プライマーの検索、PCR法の改良を行いたい。

1.4.2 アリと腸内共生の細菌

ヤマアリ亜科の主なエサ資源は植物の密腺からの分泌物や同翅類昆虫の甘露等であり、消化管の形態も液性食に適応している。これらのエサ資源は栄養的にバランスのとれた物ではない。しかし実際には動物性のエサ資源も利用しており、共生細菌を持つ他の昆虫ほど強い制約を受けているわけではない。ところが、ヤマアリ亜科に関してエサ資源の栄養構成と共生細菌-宿主の関係についてはほとんど研究がなされていない。共生細菌がどのような機能をしているのか、そしてそれとヤマアリ亜科の野外生態との関係については今

後の課題である。

1.5 参考文献

1）松本忠夫：熱帯林の地表・地中で活躍する社会性昆虫に関する海外調査.「精神のエクスペディション」363-373ページ，東京大学（1997).

2）Miura, T. and Matsumoto, T. : Diet and nest material of the processional termite Hospitalitermes and cohabitation of Termes (Isoptera:Termitidae) on Borneo Island. Insectes Sociaux, 44 : 267-275 (1997).

3）松本忠夫：シロアリの栄養生態学，遺伝，49 31-38頁（1995).

4）Dasch G.A., Weiss E. anc Chang K.P. : Endosymbionts of insects. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1 (ed. N.R.Krieg), pp.881-883 (1984).

5）Pegler D.N. & Vanhaecke M. : Termitomyces of southeast Asia. Kew Bulletin 49 : 717-736 (1994).

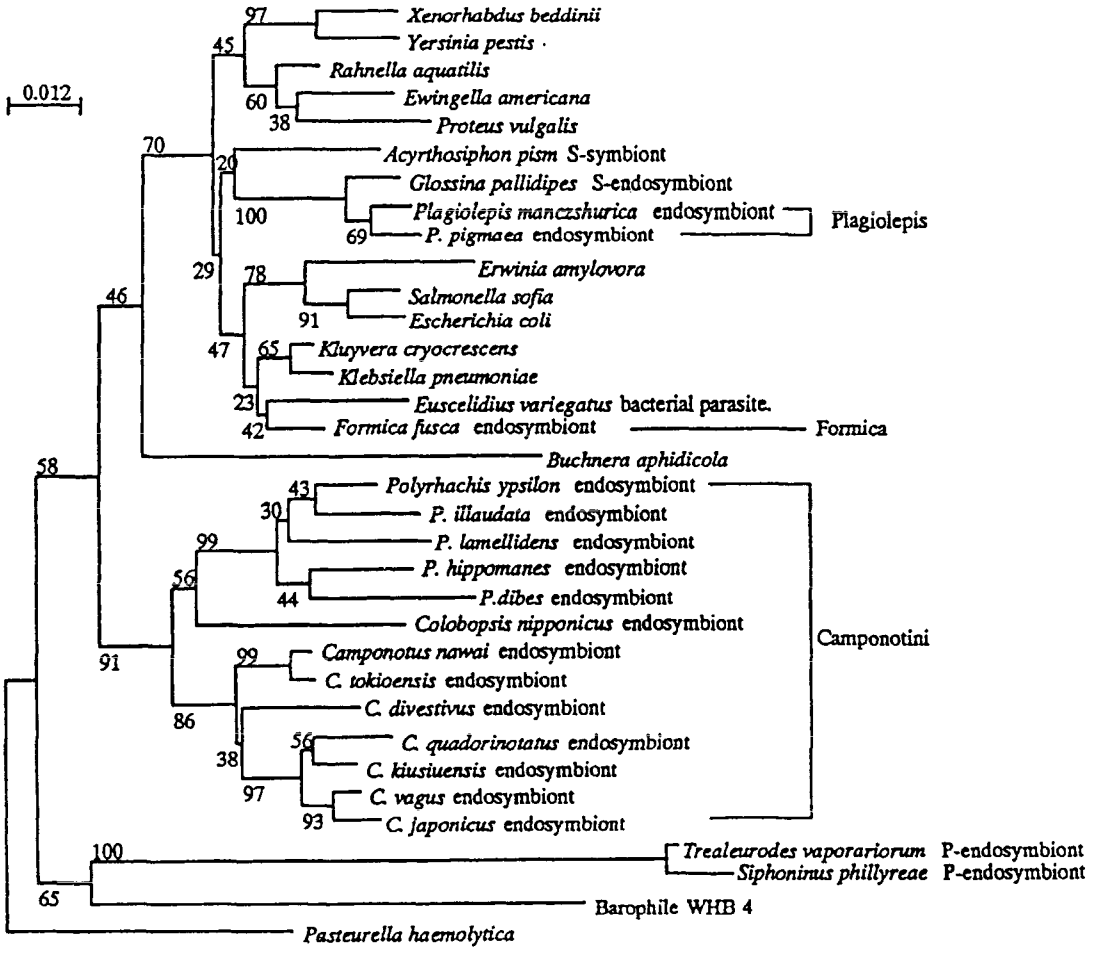


図１　近隣結合法による腸内細菌科系統関係
Note: 16SrRNA539bp, 100回ブートストラップ

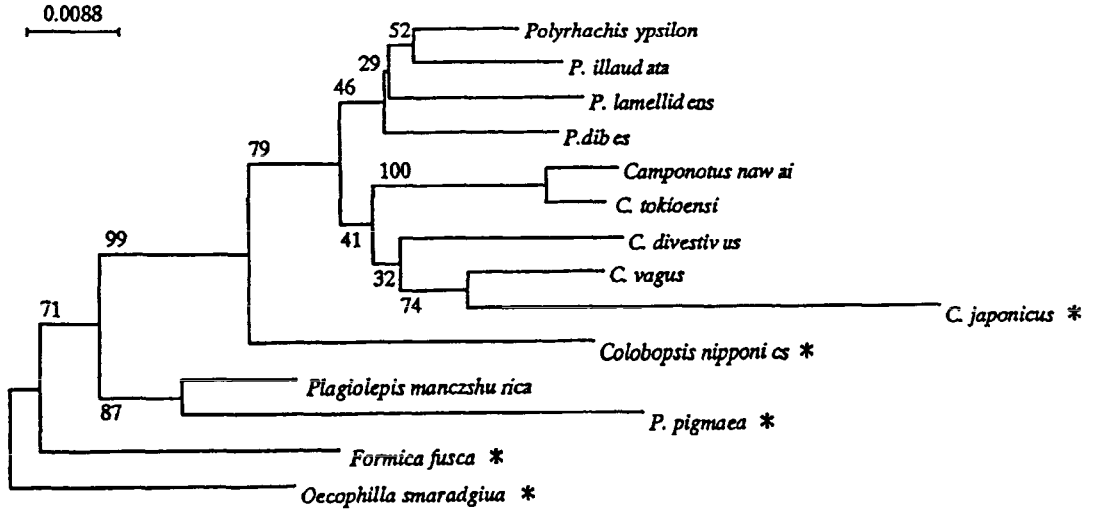


図２　近隣結合法による共生体を持つヤマアリ亜科５属の系統関係
Note: CO I 650bp, 100回ブートストラップ

2. リグニン分解過程の高度解析のための基質開発とそれを用いた複合生物機能の解析

（東京農工大学大学院　片山義博助教授）

2.1 緒　　言

リグニンは三次元網状構造を持つ芳香族高分子化合物として、樹木を始めとして全ての維管束植物の主要な細胞壁成分として存在しており、地球上におけるその生産量は毎年数百億トンに上ると推計されている。植物の生命活動の終了に伴い、リグニンはセルロースやヘミセルロースなど細胞壁を構成する多糖類とともに土壌生態系の様々な微生物によって分解され二酸化炭素へと循環される。セルロースやヘミセルロースなど多糖類は、単純な単位間結合から構成される線状高分子化合物であるため多様な微生物が生産するセルラーゼやキシラナーゼなどの酵素によって単糖類へと変換され速やかに分解代謝される。そのためセルロースやヘミセルロースなど細胞壁多糖類成分は、微生物酵素によって容易に変換可能な細胞壁成分として多方面で利用技術が開発されてきた。

それらとは対照的にリグニンは、多様な炭素－炭素結合やエーテル結合など複雑な化学構造から構成される三次元網状構造を持つ芳香族高分子化合物であるため（図1[1]）、微生物的に極めて分解されにくい植物成分としてその分解過程に関する研究は難しく、最近に至るまでその利用技術は燃焼や土壌改良など極めて限定的なものであった。しかし微生物的に極めて分解されにくいリグニンの性質は、植物の枯死に伴って放出された後も容易に二酸化炭素へと変換されないことから、大気中の二酸化炭素を安定に長期固定する事ができ、地球温暖化対策のための極めて有効な二酸化炭素削減機能をそなえていると考えられる。

微生物的に極めて分解されにくい植物成分としてのリグニンも、地球生態系を構成する複合的な生物機能によって徐々に二酸化炭素へと分解されており、地球の炭素循環の重要な反応過程を担っている。その分解過程はリグニンの化学構造の多様性を反映して多様な分解酵素反応によって構成され、その過程は大きく分けて次の二つの過程に分類する事ができる。その第一は、高分子リグニンの低分子化過程に係わる特異性の低いラジカル反応などを介する分解反応であり[2]、第二は、多様な構造へと低分子化したリグニン構造を特異的に分解し、そこから生物的エネルギー（ATP など）を獲得するための特異的酵素が多様に関与する整然とした分解過程である（図2）[3)-5)]。これらの2つの過程をへてリグニンは二酸化炭素と水へと完全分解されるが、これら2つの分解過程は担子菌などの糸状菌、バクテリア、白蟻腸内の生物群、草食動物のルーメン生物と言った様々な生物が複合的に関与して地球上の壮大なリグニン分解過程を構成している。

本研究は第一に、これらのリグニン分解過程に関与する複合生物系において機能している特異的で多様な酵素触媒機能を明らかにする事により、バイオマス資源としてのリグニンの新しい利用技術の開発を目指して実施する。第二に、リグニンの分解過程に関与する酵素反応の多くが、リグニンの化学構造の多様性を反映して極めて多様な特異性と反応機構を備えたこれまで知られていない新規酵素触媒である事に着目して、それらリグニン分解過程関与する酵素機能を新しい工業的物質変換プロセスに利用する可能性を将来的課題として取り組む。

本研究のプロジェクトにおける実施課題は、「リグニン分解過程の高度解析のための基質開発とそれを用いた複合生物機能の解析」であり、そのために先ず、リグニンの複雑な化学構造のうちリグニン単位間結合の50%を占めるとされる主要化学構造であるアリールグリセロール-β-アリールエーテル結合[6]（図3）の分解に関与する生物機能の解析を目的として、その反応過程を高感度に追跡する新たなリグニンモデル基質の開発を進めた。第二に、アリールグリセロール-β-アリール結合分解機能の高度解析のためのリグニンモデル基質と平行して、高分子リグニンにたいする生物機能を解析するための高分子合成リグニン（DHP: Dehydrierungspolymerisat）を合成し、複合生物機能による高分子リグニンの分解過程を解析する実験系を構築する。第三に、アリールグリセロール-β-アリール結合分解機能の高感度解析のためのリグニンモデル基質を用いて、バクテリアと糸状菌を対象にアリールグリセロール-β-アリール結合分解機能の生態系からの探索を行った。第四に、バクテリアや糸状菌など広範な微生物に広がるリグニン分解機能を、遺伝子機能としてリグニン利用技術として用いる事を展望し、木材分解性担子菌を宿主とした遺伝子組換系の開発に取り組んだ。

2.2 実　　験

2.2.1 アリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能の高感度解析のための蛍光リグニンモデル化合物（アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテル）の化学合成

(1)アセトバニロンのベンジル化（Scheme 1, 反応1）

アセロバニロン（Acetovanillone）30 gを120mℓの乾燥エタノールに溶解し、別に水酸化カリウム11.7 gを120mℓの乾燥エタノールに溶解する。両エタノール溶液を混合しエバポレーターでエタノールを留去した後真空ポンプにて十分乾燥する。乾燥した固形物に360 mℓの乾燥エタノールを加え溶解し、同時にベンジルクロライド（Benzylchoride）25 gを加えて4時間環流する（環流中、KClが生成して突沸の原因となるので注意が必要）。反応の進行をTLCで確認後、大量の氷水に注いで白色沈殿を得る。再結晶はエタノール：水（1：1）で行い針状結晶を得る。

(2)ベンジル化アセトバニロンの臭素化（Scheme 1, 反応2）

ベンジル化アセトバニロン40 gを乾燥エーテル520mℓ、乾燥ジオキサン390mℓの混合溶媒に加えて、温度計および滴下ロートがセット可能な丸底フラスコ中で溶解させる。丸底フラスコをスターラ上にセットされた氷水バスに固定し、マグネット（撹拌子）をフラスコ内に入れ溶液を撹拌する。滴下ロートに臭素30 gを加え撹拌下ゆっくりと丸底フラスコに滴下する。その際反応液の温度は20℃以下に保つよう滴下速度を調節し、同時に滴下した臭素の色が反応の進行で薄くなるので、反応液の色が薄くなることを確かめながら滴下する。

（最初は反応がなかなか始まらないので臭素の色が薄くならないが、反応が始まると色が消え始めるので、色の消失を確認した後滴下を再開して温度の上昇に注意しながら

最後まで滴下する）反応の進行は TLC で確認する（ベンゼン：酢酸エチル＝７：３を展開溶媒にすると、臭素化物はベンジル化アセトバニロンよりも高Rf物質として移動する)。確認後、2-3 リットルの氷水に注ぎエーテルにて抽出する、その際ピンク色の固体が生成するので回収して酢酸エチルに溶解させエーテル抽出液と一緒にする。エーテル・酢酸エチル混合抽出液は、脱イオン水で 2-3 回洗浄して無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち、エバポレーターで濃縮幹固させる。

(3)ウンベリフェロンのエーテル結合の形成（Scheme 1, 反応３）

ベンジル化アセトバニロンの臭素化物 12ｇ、ウンベリフェロン 6.6ｇ、無水炭酸カリウム（K2CO3）９ｇを乾燥アセトン 600mℓ に懸濁し、３時間環流する。反応終了後 1200mℓ の脱イオン水を加えた後、300mℓ のクロロホルムで３回繰り返し抽出する（脱イオン水を投入した段階で水層は pH10 以上であるため、未反応のウンベリフェロンはクロロホルム層に抽出されてこないので分離可能である)。クロロホルム層は、弱アルカリ水溶液で洗浄後、脱イオン水で繰り返し洗浄した後無水硫酸ナトリウムを投入して乾燥。エバポレーターで留去した後加熱下クロロホルムに少量の酢酸エチルを加えながら溶解させ、冷蔵庫中で結晶を得る。TLC による確認は、ジクロロメタン：メタノール＝20：１を展開溶媒として行う事が出来る。

(4)エーテル結合物質の側鎖ホルミル化反応（Scheme 1, 反応４）

ウンベリフェロンのエーテル結合物質 1.5ｇ、無水 Potasium Carbonate（K2CO3）28mg、ホルムアルデヒド－酢酸エチルエステル混合液 15mℓ、乾燥酢酸エチルエステル８mℓ を 100mℓ 容のナス型フラスコに投入するとゲル状の懸濁物となる。撹拌子を加えて環流用冷却装置を組立て、スターラ付き waterbath 上で徐々（約 20 分かけて）に加熱し５分間環流する（この段階でゲル状態は無くなり完全に溶解した)。環流後、waterbath の温度を下げ25℃で５時間反応を続ける。反応中に固形物が析出するが反応を継続する（この固形物が目的物である)。

懸濁物に 50mℓ の脱イオン水を加え十分懸濁して（無水 Potasium Carbonate を溶解させる）吸引濾過する。炉液は、クロロホルム：酢酸エチルエステル＝１：１混合液 20mℓ で抽出する。固形物は、さらに蒸留水で十分洗浄しながら吸引濾過を繰り返す。この洗浄固形物が目的物である。クロロホルム：酢酸エチルエステル抽出液はエバポレーターで留去して蒸留水で同様に洗浄し固形物として回収する。

（ホルムアルデヒド－酢酸エチルエステル混合液）の調製法：ホルムアルデヒド水溶液（市販物約 37%）10mℓ を酢酸エチルエステル 50mℓ で３回抽出し、酢酸エチルエステル層をモレキュラーシーブを加えて乾燥する。

(5)ベンジル化アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルのベンジル基の除去（Scheme 1, 反応５）

それにベンジル化アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテル（側鎖α炭素＝カルボニル型）2.0ｇを 95% 特級エタノール（市販品でよい）25mℓ に加え十分溶解さ

せる。それに10%パラジウム炭素：Pd-C（または5%）100mg（5%に場合は200mg）を加えよく懸濁させる。常圧、水素雰囲気下（水添装置を用いる）で約2時間撹拌を続け、水素の吸収がなくなった時点で反応をやめ、TLCでベンジル基の分離状態を確認する。不十分な場合は更に水素添加反応を継続する。反応終了後、桐山ロートで吸引濾過しその炉液に100mℓの蒸留水を加え十分混合した後、酢酸エチルエステルで抽出する(50mℓで3回繰り返す)。無水硫酸ナトリウムを加え乾燥後、エバポレーターで濃縮してベンゼン－酢酸エチルエステルより再結晶を得る。

(6)アリールグリセロールβ-ウンベリフェロンエーテルの側鎖α炭素カルボニル基の還元（Scheme 1, 反応6）

アリールグリセロールβ-ウンベリフェロンエーテル（側鎖α炭素＝カルボニル型）化合物2.0g、水素化ホウ素ナトリウム（Sodium borohydrate）1.1g（保存状態が悪い場合や、古いものは分解しているので多量添加する必要がある）を95%特級エタノール（市販品でよい）50mℓに加える。スターラと撹拌子による撹拌下、4℃で約10時間反応を続ける。反応終了後、75mℓの蒸留水を加えクロロホルム－酢酸エチルエステル（1：1）混合溶媒50mℓで3回抽出する。無水硫酸ナトリウムを加え乾燥後、エバポレーターで濃縮して四塩化炭素－酢酸エチルエステルより再結晶を得る。（出発物質がエタノールに溶けにくい場合は、ジオキサンなど溶解性の高い溶媒に変更して実施する）

2.2.2 高分子リグニンにたいする生物機能を解析するための高分子リグニンモデル基質（DHP：Dehydrierungspolymerisat）の化学合成

(1)バニリンとマロン酸を出発物質とするフェルラ酸合成（アルドール縮合）（Scheme 2, 反応1）

乾燥したバニリン50g、乾燥したマロン酸70g、ピペリジン4mℓ、アニリン数滴を、モレクキュラーシーブにて乾燥したピリジン160mℓに溶解して、ナス型フラスコに塩化カルシウム管をセットし、モレクキュラーシーブを反応液に適当量加えて30℃から45℃程度で10日から14日放置して反応（二酸化炭素の発生による気泡が観察されなくなる時点を反応の終了と考える)。反応終了後、ピリジン溶液は約2リットルの氷水にゆっくりと撹拌下に注ぐと白色沈殿が生成する、その際濃塩酸を加えてピリジン臭を押さえる。白色沈殿部を炉別し、風乾後エタノール：水より針状結晶を得る。

(2)フェルラ酸のメチル化によるフェルラ酸メチルエステルの合成（Scheme 2, 反応2）

フェルラ酸50gを500mℓの乾燥メタノール（モレクキュラーシーブにて乾燥）に溶解し、溶媒の1／50量の濃硫酸を加え6時間環流する（沸騰石を忘れない)。反応終了後、エバポレーターにてメタノールをある程度留去したのち、約2リットルの氷水に撹拌下滴下する。堅い固形の沈殿が生じた場合吸引濾過する。オイルあるいは液状の場合は酢酸エチルエステルにて抽出し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥しエバポレーターで濃縮し塊状でフェルラ酸メチルエステルを得る（融点が低いので結晶化しにくい)。

(3)フェルラ酸メチルエステルのテトラヒドロピラニル化による水酸基の保護
（Scheme 2、反応3）

反応に先立って、使用するガラス器具を乾燥しておく。乾燥したフェルラ酸メチルエステルを約20倍量（W／V）の乾燥ジクロロメタンに溶解する。フェルラ酸メチルエステルの1.5倍モル量の3,4-Dihydro-2H-pyran、1.5倍モル量のp-トルエンスルホン酸（触媒）を加え、窒素雰囲気下0℃で3時間撹拌する。3時間後にトリエチルアミン数滴を加え、p-トルエンスルホン酸を中和し反応を終了させる（その際、反応液は褐色から黄色に変化する）。反応液を飽和重曹水溶液（NaHCO3）で数回洗浄し、飽和食塩水にて数回洗浄して有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥しエバポレーターで濃縮乾固させる。n-ヘキサンから再結晶を得る。

(4)テトラヒドロピラニル化フェルラ酸メチルエステルの還元によるテトラヒドロピラニル化コニフェリルアルコールの合成（Scheme 2, 反応4）

反応に用いるテトラヒドロフランは、まずモレキュラーシーブスにて乾燥しその後粉末のLiAlH4を加え窒素雰囲気下で環流して完全に水を除去しておく。十分乾燥したテトラヒドロピラニル化フェルラ酸メチルエステル5.84gを乾燥テトラヒドロフラン30mℓに溶解し滴下ロートに保存する。4口フラスコに乾燥テトラヒドロフラン100mℓを加え、LiAlH4 1.52gを懸濁し、すばやく撹拌棒－モーター、温度計、乾燥窒素ガス管、滴下ロートをセットする。反応液を-40℃～-30℃に保ち2時間かけて滴下ロートのテトラヒドロピラニル化フェルラ酸メチルエステル溶液を窒素雰囲気下ゆっくりと加える。2時間後、反応液の温度を0℃にまで上げ、水を含んだテトラヒドロフラン（水と十分混合させ分離してきたテトラヒドロフラン層を用いる）150mℓを滴下ロートから徐々に加えて過剰のLiAlH4を分解する。反応液に酢酸エチル200mℓを加え、ドライアイスの小片を投入して弱酸性にする。その後さらに酢酸エチル300mℓと蒸留水100mℓの混合液を加えて抽出する。有機層は飽和食塩水にて数回洗浄して無水硫酸ナトリウム上で乾燥しエバポレーターで濃縮してオイルとして反応生成物を得る。

(5)テトラヒドロピラニル化コニフェリルアルコールの保護基テトラヒドロピラニル基の除去によるコニフェリルアルコールの合成（Scheme 2, 反応5）

テトラヒドロピラニル化コニフェリルアルコール2.5gをテトラヒドロピラン100mℓに溶解し、1N-HCl・10mℓを加え窒素雰囲気下0℃、30分間撹拌しながら反応する。反応終了後、反応液に300mℓの酢酸エチルエステルを加え、飽和食塩水で数回洗浄して塩酸を除去する（pH試験紙で確認する）。無水硫酸ナトリウム上で乾燥しエバポレーターで濃縮してオイルを得る、乾燥n-ヘキサン：エーテルから再結晶を得る。

(6)ペルオキシダーゼ：過酸化水素を用いたコニフェリルアルコールの脱水素重合反応による高分子リグニンモデル基質（DHP）の調製

コニフェリルアルコール1gを、50mℓのアセトンに溶解したコニフェリルアルコール溶液を調製する。さらに3％過酸化水素水溶液を20mℓ調製する。緩衝液として

100mM Potassium Phosphate Buffer（pH 6.0）（調製法：1.36 g の Pottasium Phosphate monobasic に 80mℓ の蒸留水を加え溶解させる。水酸化ナトリウム水溶液にて pH6.0 に調整した後 100mℓ になるまで蒸留水を加える）340mℓ にアセトン 100mℓ を投入し反応液を調整する。アセトン－100mM Potassium Phosphate Buffer（pH 6.0）に、Hose raddish 由来ペルオキシダーゼ（sigma, 44units／mg, crude, solid）6 mg を加え酵素－緩衝液を調整する。撹拌下の酵素－緩衝液に対し、コニフェリルアルコール－アセトン溶液および 3 %過酸化水素水溶液を 14 時間かけて室温条件下に滴下する。14 時間後、ペルオキシダーゼを 4 mg 追加してさらに反応を 12 時間継続する。

反応終了後、反応液は 4000rpm、10min にて遠心分離し、沈殿物に蒸留水を加えて十分懸濁して同じ条件下で遠心分離して洗浄する。洗浄－遠心分離を 3 回繰り返す。沈殿物は風乾後、五酸化リンの存在下で真空乾燥する。得られた試料を crude-DHP として使用する。高分子 DHP の精製には、この crude-DHP を最小量のジオキサン－水（9 : 1）混合溶液に溶解させ、大量のエーテル中に撹拌条件下に少量づつ滴下して沈殿物を生成させる。この沈殿物を遠心分離して得た試料を高分子 DHP として使用する。

2.2.3 アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルを用いたアリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能を持つ微生物の探索

糸状菌の生育培地である vogel 培地（表 1）、あるいは *Pseudomonas* 属細菌の生育培地であるW培地[7] 2 mℓ に、ウンベリフェロン-β-アリールエーテルを 0.01% 添加したワッセルマン試験管に、東京農工大学付属農場、府中の森公園など様々な場所から採取した土壌試料約 100 種類を投入して、28℃ で約 1 ～ 2 週間静置培養し培養液中に遊離したウンベリフェロンを蛍光分析計で定量した。

2.2.4 木材分解性担子菌を宿主とした遺伝子組換系の開発のための分生子の調整

本研究では先ず、リグニン分解活性を持つ代表的木材分解性担子菌として *Phanerochaete chrysosporium* を用いた宿主－ベクター系の確立をめざし、分生子の単離調整法を確立した。*P. chrysosporium* は Vogel 寒天培地にて 6 日間、28℃・暗所条件下で培養した。その後直ちに 4 ℃・暗所条件下に 1 週間おいて分生子を生成させた。分生子は寒天培地表面の菌糸をはがして 10 mℓ の滅菌水に懸濁後、ミラクロス（CALBIOCHEM 社製）で濾過する事により得た。本研究では、この分生子を滅菌水で 3 回洗浄し血球計算盤にて計測して所定の濃度に調整した。得られた分生子の発芽活性を評価するため、計測した分生子懸濁液を Vogel 寒天培地に摂取して生成する菌糸の数を計測した。

2.3 結果および考察

2.3.1 リグニン分解過程の高度解析のための基質開発

アリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能の高度解析のためのリグニンモデル基質、アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルの合成反応を Scheme

1に示した。この合成反応において重要な段階は、ウンベリフェロンのエーテル結合の形成反応と反応混合物からの未反応のウンベリフェロンの除去操作である。遊離ウンベリフェロンは高感度の蛍光物質であるため僅かに混在した場合も、強い蛍光を持つことから生物のアリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテル分解機能の検出の妨げになる。今回は、水溶液のpHを10以上に保つことで遊離ウンベリフェロンを水層に溶解させクロロホルム層に抽出させない条件で行い、混在を極力抑える事に成功した。さらに精製する方法は、シリカゲルカラムによるクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝20：1）により分離する事により、アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルは混在する遊離ウンベリフェロンより高移動度を持つため、遊離ウンベリフェロン成分を除去する事が出来る。

この合成反応において第二に重要な反応段階は、側鎖のホルミル化反応でホルムアルデヒド－酢酸エチル混合液を用いる事で反応は正常に進行する。しかし反応中に生成物が不溶化するのでその精製には注意を要する。ホルミル化をさらに強力なパラホルムアルデヒドを用いて行うと反応は失敗し未同定の物質を生成する。図4に最終的に合成されたアリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルのNMRスペクトルとそのシグナルの帰属を示した。

2.3.2 高分子リグニンモデル基質（DHP）の調製とコニフェリルアルコールの合成

植物細胞壁にセルロース、ヘミセルロースと共存している高分子リグニンの分解過程を追跡するためには、細胞壁内の高分子リグニンが生物的な分解過程でどの様な変化を受けているかを正確に分析する必要がある。そのためには、分解前の細胞壁中のリグニンの化学構造や分子量を変化させることなく単離する事、さらに生物分解を受けた植物材料から同じく化学構造や分子量を変化させることなく単離する事が必要である。しかし細胞壁中のリグニンの化学構造や分子量を変化させることなく単離する事は殆ど不可能で、分解前の植物細胞壁から単離されるリグニン試料（MWL）は細胞壁中に存在している全リグニンの最大50%程度で、その分析からリグニンの全体的変化を議論することは難しい[8]。植物細胞壁にセルロース、ヘミセルロースと共存している高分子リグニンの分解過程を分析するには、リグニンの生合成反応を試験管内で行い植物細胞壁中に存在するリグニンと化学構造、分子量において殆ど同一の高分子リグニンモデル基質（DHP）を用いる方法が有効である。本研究では、リグニン生合成の最終的な前駆体であるコニフェリルアルコールのペルオキシダーゼ－過酸化水素による、酵素的脱水素重合反応を試験管内で行い高分子リグニンモデル基質を合成した。その13C-NMRスペクトルを図5に示した。

さらに本研究では、リグニン生合成の最終段階であるペルオキシダーゼ－過酸化水素による酵素的脱水素重合反応を試験管内で行うために、その反応基質であるコニフェリルアルコールを化学合成した。現在コニフェリルアルコールは高価格であるが市販されておりそれを利用する事が出来るが、本研究ではコニフェリルアルコールを新しい保護基（テトラヒドロピラニル基）を用いて合成する事によって、比較的大量に長期間保存できる合成経路を用た。この合成法の特徴は、エステルの$LiAlH_4$によるアルコールへの還元反応をフェノール性水酸基の保護基であるテトラヒドロピラニル基を結合したまま行い、そのま

ま長期保存出来ることである。フェノール性水酸基が保護されていない状態ではコニフェリルアルコールは極めて不安定で容易に重合してしまうので、コニフェリルアルコールとして長期保存は不可能である。しかも、エステルの LiAlH4 によるアルコールへの還元反応は厳しい乾燥条件が必要であり、コニフェリルアルコールの使用の度に手軽に合成する事は出来ない。従ってこの還元反応を一度に終わらせ安定に保存して必要に応じて使えるようにする事が課題であった。本研究では、エステルの LiAlH4 によるアルコールへの還元反応をフェノール性水酸基の保護基であるテトラヒドロピラニル基を結合したまま行い、その状態で長期保存し必要に応じて保護基を外して使用する方法を確立した。

2.3.3 アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルを用いたβ-アリールエーテル結合分解機能を持つ微生物の探索と担子菌の遺伝子組換系の開発のための分生子の調製

東京農工大学付属農場、府中の森公園など様々な場所から採取した土壌試料約 100 種類を投入して探索した結果、*Pseudomonas* 属細菌の培地であるW培地においては β-アリールエーテル結合分解機能を強く示す微生物の存在は認められなかった。すでに我々が単離してその遺伝子構造を明らかにしている *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 は、土壌細菌としては特異な機能として β-アリールエーテル結合分解機能を持つと考えられる（図２）。一方糸状菌の培地である Vogel 培地においては、２種類の土壌試料においてウンベリフェロンの遊離が認められ現在その再現性の確認を進めている。バクテリアや糸状菌など広範な微生物に広がるリグニン分解機能を、遺伝子のレベルでリグニン利用技術として用いる事を目的に、木材分解性担子菌を宿主とした遺伝子組換系の開発に取り組んだ。本年度は代表的なリグニン分解担子菌として知られている *Phanerochaete chrysosporium* を用い Vogel 寒天培地にて活性な分生子を生成させる事に成功した。現在、分生子の変異処理によって栄養要求性変異株の作製に取り組んでいる。

2.4 結　　語

本研究は、「リグニン分解過程の高度解析のための基質開発とそれを用いた複合生物機能の解析」を目的として、先ず第一にリグニンを構成する複雑な化学構造のうちリグニン単位間結合の 50% を占める主要化学構造である、アリールグリセロール-β-アリール結合（図３）の分解に関与する生物機能の解析を目的として、その反応過程を高感度に追跡する新たなリグニンモデル基質の開発を進めた。

アリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能の解析のためのリグニンモデル基質として、アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルの化学合成に成功した。この高感度蛍光基質を用いて、すでに本プロジェクトの渡辺らは白蟻腸内にリグニンの主要単位間結合であるアリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能が存在する可能性を示している。このように、この高感度蛍光基質は複合生物系におけるリグニン分解機能を検出評価するための極めて有力な基質として広範囲に利用可能である事が明らかになり、本プロジェクトに大きく貢献する事が出来る。

残された課題として、今回合成したモデル基質が低分子化合物であるため高分子リグニ

ンの分解過程に関与するアリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解機能を正確に評価する基質として十分な機能を備えているかと言う問題がある。そのため次年度は、高感度蛍光基質をリグニン高分子に共有結合させた高分子蛍光基質の開発をすすめ、それを用いた高分子リグニン分解過程における複合生物系のアリールグリセロール-β-アリールエーテル結合分解酵素機能を解析する研究方法を開発する。高分子リグニンへの蛍光基質の結合は、本年度実施し成功したコニフェリルアルコールのペルオキシダーゼー過酸化水素による酵素的脱水素重合反応を、蛍光基質の共存下試験管内で行い高分子リグニンに結合させることにより可能である。

高感度蛍光基質を用いた β-アリールエーテル結合分解機能を持つ微生物の探索は、本年度の成果であるウンベリフェロンの遊離を認めた土壌試料を基に、次年度は微生物の単離をすすめその分解機能を評価する。同時に代表的木材腐朽菌であるカワラタケ、シイタケ、シメジ、*Phanerochaete chrysosporium* について、それらの β-アリールエーテル結合分解機能を調査し、この特異的リグニン分解機能の木材分解性担子菌における分布を明らかにする。同時に担子菌の遺伝子組換系の開発のため次年度は引き続き、分生子の変異処理により栄養要求性変異株の作出と、遺伝子導入の際不可欠なプロトプラスト化とその再生技術の確立に取り組む。

2.5 参考文献

1) H. Nimz, Angew. Chem. 13, 313 (1974).

2) T. Umezawa and T. Higuchi : Aromatic ring cleavage of β-O-4 lignin model dimers without prior demethoxylation by lignin peroxidase. FEBS Letter, 205, 293-298, 1986.

3) Y. Katayama, S. Nishikawa, A. Murayama et al. : The metabolism of biphenyl structures in lognin by the soil bacterium (Pseudomonas paucimobilis SYK-6). FEBS Letter, 233, 129-133, 1988.

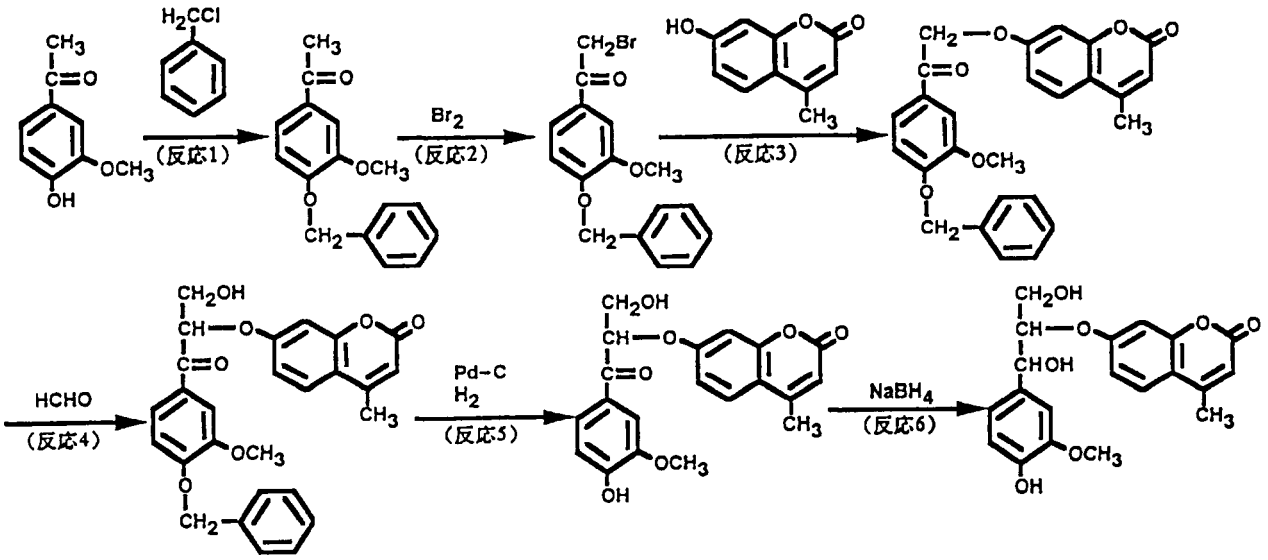
4) E. Masai, Y. Katayama, et al : Cloning and Sequencing of the gene for a Pseudomonas paucimobilis enzyme that cleavage b-arylether, Journal of Bacteriology, 173, 7950-7955, 1991.

5) E. Masai, Y. Katayama, SKubota et al. : Bacterial Enzyme Degrading Model Lignin Compound, b-Etherase is a Member of the Glutathion S-Transferase Super Familly., FEBS Letter, 323, 135-140, 1993.

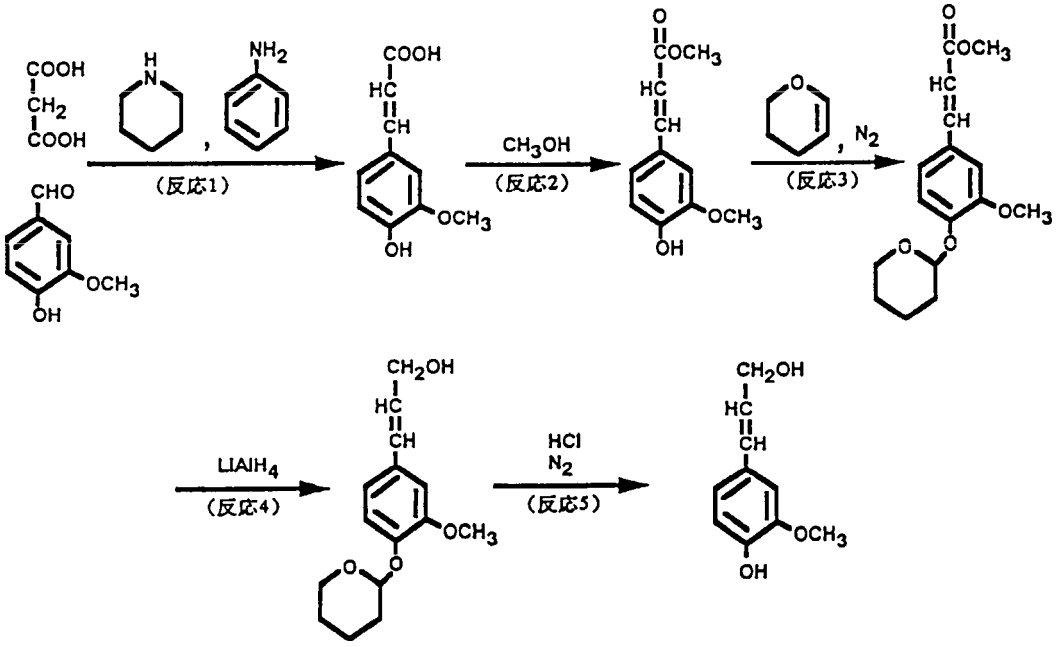
6) 中野準三（編），リグニンの化学（基礎と応用），ユニ出版，131頁，1990年.

7) K. Yano and T. Nishi : pKJ1, A Naturally Occurring Conjugative Plasmid Coding for Toluene Degradation and Resistance to Streptomycin and Sulfonamides. Journal of Bacteriology, 143, 552-560, 1980.

8) 中野準三（編），リグニンの化学（基礎と応用），ユニ出版，37頁，1990年.



Scheme 1　アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルの化学合成



Scheme 2　リグニン前駆体化合物コニフェリルアルコールの化学合成

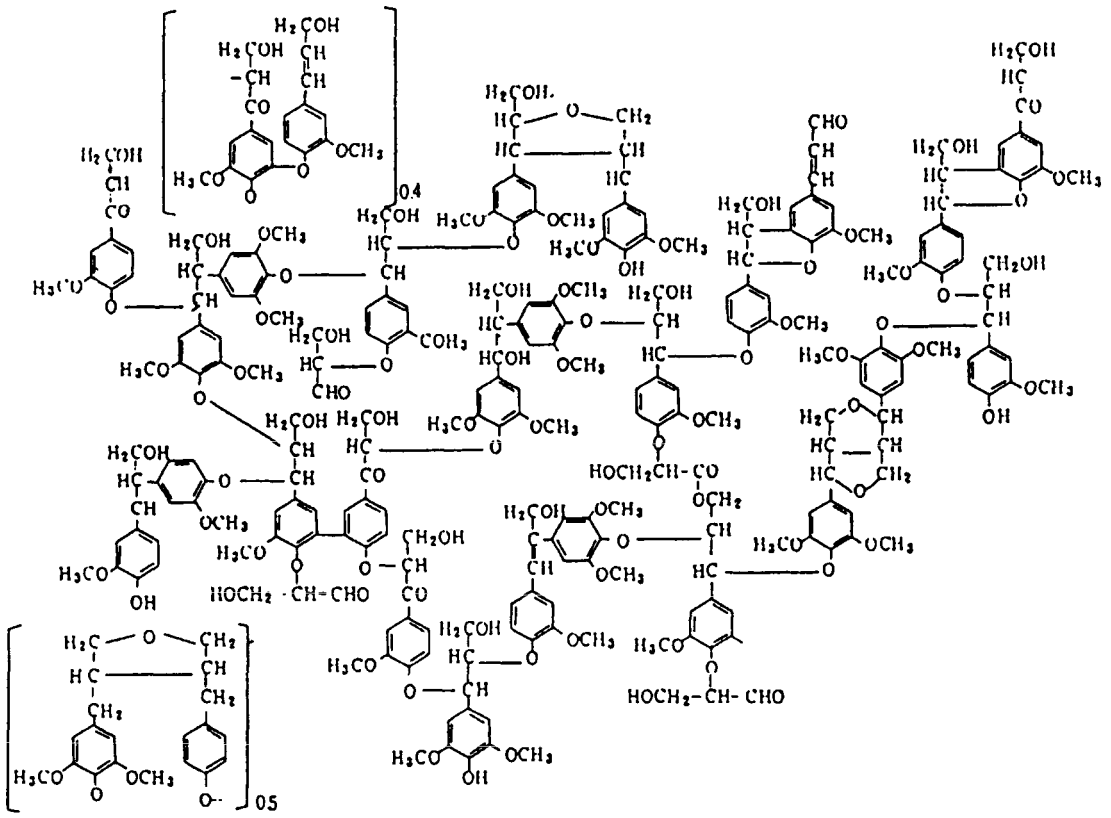


図1　Nimzが提案したbeech材リグニンの構造模型[1)]

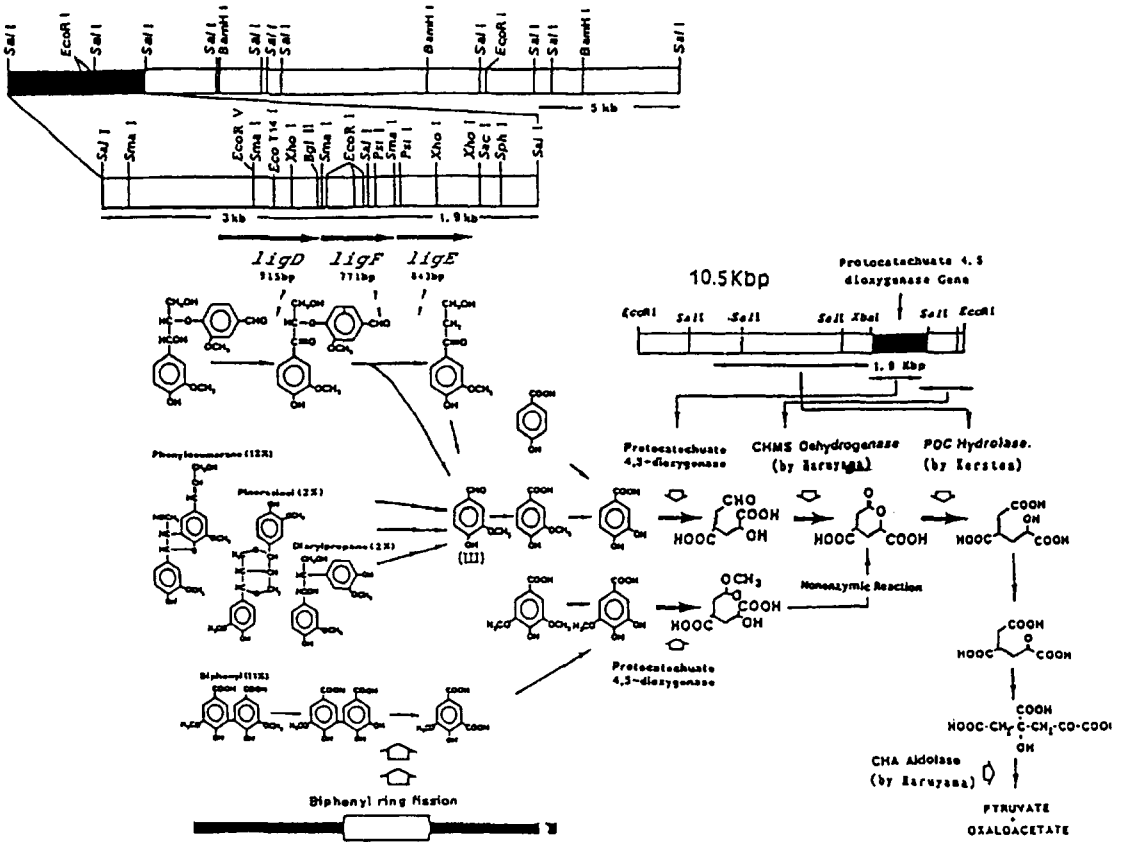


図2　*Sphingomonas Paucimobilis* SYK-6が示すリグニン低分子化合物の特異的代謝経路とそれらを指令する遺伝子

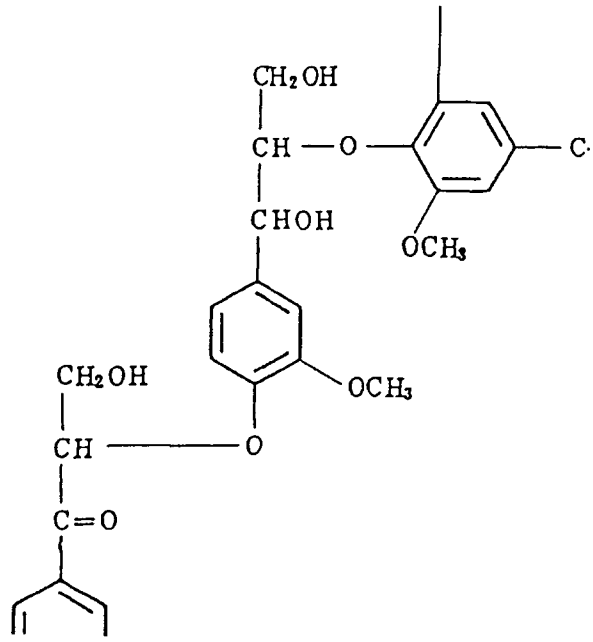


図3　アリールグリセロール-β-アリールエーテル結合
（リグニンの単位間結合の50%を占めると考えられる主要化学構造）

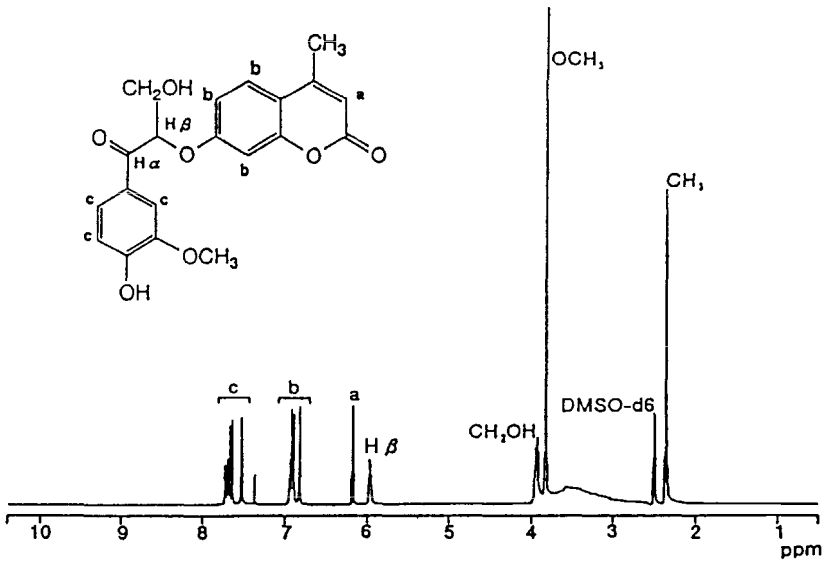


図4　アリールグリセロール-β-ウンベリフェロンエーテルの ^{1}H－NMR スペクトル

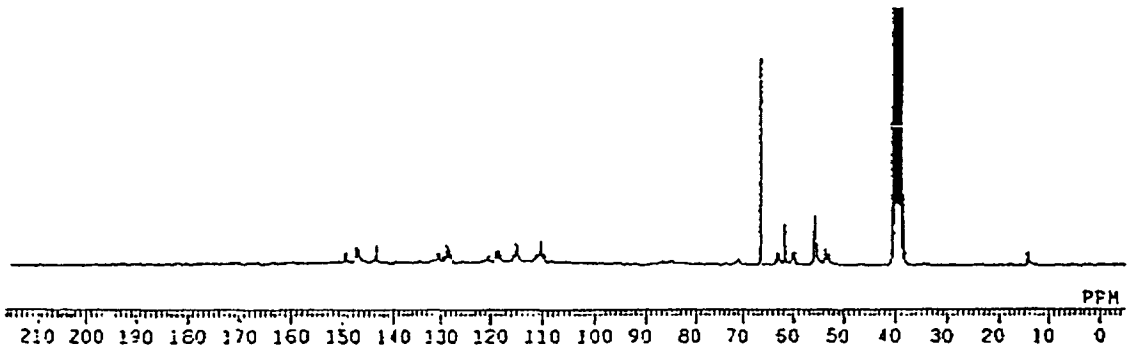


図5　高分子リグニンモデル化合物（DHP）の ^{13}C－NMR スペクトル

表1　Vogel 培地組成

Vogel 培地組成（1000 ml）	Stock Solition (20ml)	NH_4NO_3	1.00%
		Sodium Citrate	1.25%
		K_2HPO_4	2.50%
		$MgSO_4$ $7H_2O$	0.10%
		$CaCl_2$ $2H_2O$	0.05%
	Trace Metal (1ml)	Citric Acid	5.00%
		$ZnSO_4$ H_2O	5.00%
		$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ H_2O	1.00%
		$CuSO_4$ H_2O	0.25%
		$MnSO_4$ H_2O	0.05%
		H_3BO_3	0.05%
		Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.05%
	Biotin Solution (100ml)	Biotin	0.01%
	Glucose (10g)		
	Yeast Extract (2.5g)		

第 3 章　石油代替有用資源生産技術

①熱帯油糧植物の高度利用技術

1. 緒　　言

自然界では生物の多くは同じ生物間同士あるいは他の生物と多彩な相互作用を織成し、何らかの影響を及ぼし合いながら生命活動を維持している。植物をとりあげても、他感作用（allelopathy）に代表されるように植物間の情報交換を通して、他植物の侵入を阻止し群生や集落を築いている。植物－微生物間のフロラ（flora）においてはさらに複雑である。植物に微生物や菌が侵入するとそれを即座に認識し、ファイトアレキシン（phytoalexin）やエンドファイト（endophyto）のような抗菌性物質を生合成する。この物質が引き金となって、植物は細胞内の防御機構を強化すると考えられている。他方、根粒菌や菌根菌のように植物に共生することによって、微生物の生育だけでなく植物の物質代謝を促進している場合もある。このように植物－微生物の相互作用を見た場合、片利的に働く場合と相利的に働く両面が考えられる。植物－動物（おもに昆虫）間でも同様に、自己防御手段として忌避物質や殺虫物質、摂取阻害物を生成する一方、昆虫の誘引物質を生産して受粉の媒介をしてもらったりする共生的な要素も見られる。

本研究では、植物を中心とした生物の複合機能を解析するとともに、その機能を高度に有効利用するための基盤技術開発を目的とした。とくに熱帯資源国の油糧植物を材料として微生物との複合系を解析し、最終的には有用物質生産の向上を目指す。

熱帯地方には多くの生物種が存在しており、その多様性を維持するために互いに複合的に作用しながら生存バランスをとっていると考えられる。また熱帯という苛酷な環境下で、植物は種々の環境ストレスに対応する適応機能も獲得し進化してきた。このような熱帯植物の生命活動を、植物－微生物複合系の観点から生化学的、分子生物学的に解析することは、植物細胞の本来持つ物質（あるいはエネルギー）生産性のポテンシャルを向上させることに大きく寄与すると考えられる。

アブラヤシ（*Elaeis guineensis*）を代表とする熱帯性油糧植物の分子生物学的研究は、ヤシ油の生産量世界第1位を誇るマレーシアを中心に精力的に行われているが、ナタネ（*Brassica napus*）やダイズ（*Glycine max*）など他の油糧作物にくらべると得られる情報はきわめて少ない。その理由として、a）ライフサイクルが長く、定植後油糧生産まで3～5年が必要、b）油糧作物としての歴史が比較的短い、c）系統的育種プログラムが適用されていないことなどが挙げられる。アブラヤシは年間を通じ連続して収穫が可能なため、単位面積当たりの植物油の生産量は他の植物の3～10倍に達するが、総生産量から見るとダイズに次ぐ第2位である。インドネシア、マレーシアを中心に栽培の拡大が見込まれ、今後、食用だけでなく石油代替エネルギーとしての需要も増加することが期待される。

しかしながら、現在この高生産性を阻むような病害が広範囲に拡大しつつあり、アブラヤシ農園経営に深刻な問題となっている。病原菌は *Ganoderma* と呼ばれる担子菌の一種で、通常樹齢15年以上のアブラヤシに病徴が現れる。殺菌剤を含め目下のところ有効な防除法は見つかっておらず、病原菌感染の診断さえ充分に行われていない。本プロジェクトでは具体的に病原菌 *Ganoderma* とアブラヤシ細胞のと相互作用を分子生物学的に

解明し、植物細胞のもつ防御機構を解析する。最終的にはこの防御機構を強化することによって、パーム油の生産性を安定的に維持あるいは向上することができると期待される。病原菌抵抗性機能の向上には、抵抗性に関与する遺伝子を改良し高発現させる予定であり、そのためには、アブラヤシ細胞の再分化系と効率の良い形質転換系（transformation system）を確立することが必須である。また、アブラヤシ細胞のもつ活発な生合成および代謝系を利用して、植物を物質生産のためのリアクターと想定し有用物質生産に高度利用するためにも、再分化系と形質転換系は重要な基盤技術である。

上記のような研究目標を達成するために、初年度は以下の実験を行い成果が得られたので報告する。

- アブラヤシ組織からのカルス誘導
- アブラヤシ形質転換に用いるベクターの開発
- アブラヤシ植物細胞からの有用遺伝子単離
- *Ganoderma* の現地採取と顕微鏡観察による菌の分類および同定

2. 実験装置および方法

2.1 微生物－植物複合系による熱帯油糧作物の組織培養・大量増殖技術

2.1.1 アブラヤシ組織の準備と調製

アブラヤシは熱帯西アフリカの雨林帯に原生するヤシ科植物の一種で、現在の品種は他の油糧作物と比較してきわめて高い生産能力を持つ[1]。インドネシアではスマトラ島、カリマンタン島、ジャワ島、スラウェシ島ならびに大イリアンに国営、民営農園が存在する（図１）。これら農園で栽培されている品種は本格的な育種開始から第２または第３世代であり、いまだ改良の余地が残されていると見られる[2]。一般的な栽培品種は、殻が厚いが生育の旺盛なデリ・タイプ（Var. *dura*）と無核のピシフェラ・タイプ（Var. *pisifera*）との間の雑種第１代品種テネラ・タイプ（*tenera* hybrid）である。しかし、これら品種は育種世代が進んでないこと、雑種親系統をおもに結実、果実に関する形質にのみ注目して選抜したことから、他の形質は十分に固定していない。したがって商品化されている品種を農園に展開した場合でも、集団中に生産能力の異なる個体が混在しているのが実状である[3]。

一方、植物は全能性（totipotency）という特性を持ち、組織の一部から個体を復元することが比較的容易である。極端な例としては分離した1個の細胞からでも完全な植物体を復元できる。この特性は、古くは挿し木、株分けといった手法で、また近年では組織を無菌的に培養する方法によって、まったく同じ形質を持つ植物個体を多数複製することを可能にしている[4]。そこで本研究では組織培養法をアブラヤシに適用し、同一の特性を持つ個体を大量かつ短期間に増殖する手法の開発を目的とした。これによって

- 病原菌など微生物と植物との関係を探る実験や形質転換（transformation）実験など、微生物－植物複合系の研究を行うための材料を安定して供給する
- 生産力や耐病性などの農業形質が優れた個体を大量増殖する

・形質転換で新たな特性を加えられた個体を大量増殖する

ことなどが期待される。

植物組織培養法の基本は順に、組織の採取、調製、カルス（callus）の誘導、植物体の再分化（regeneration)、非無菌環境への馴化（acclimation)、であり、植物種ごとに条件決定を行わなければならない。アブラヤシの組織培養は優良な性質を持つ個体の大量増殖を目的に1970年代から試みられている[5]。しかし培養由来の集団に高い頻度で果房の奇形が現れるという重大な問題が生じたため、現在なお手法開発が続いている。本実験ではスルポン（Serpong、西ジャワ州）の インドネシア科学技術応用評価庁（以下 BPPT）研究施設 BIOTEK センターにおいて培養実験を安定して継続するため、試料採取、運搬および粗調製法を検討した。

試料採取地はルバック（Lebak、西ジャワ州）のプランテーション公社 No.VII（P.T.Plantaion VII）およびキサラン（Kisaran、北スマトラ州）のバクリー・スマトラ・プランテーション社（P.T. Bakrie Sumatera Plantations、以下 BSP 社）の農園とした（図１)。未展開の未熟葉（younger leaf）を培養する場合、プランテーション公社では８から16 年生の，品種 Marihat を伐採し、生長点を含む部分を長さ 120㎝、直径 20㎝ に調製したうえで塩化ビニル製の密封容器に入れ陸路で BIOTEK センターに輸送した。BSP 社では、品種 Lonsum、Socfindo、Costa－Rika のいずれかの５年生の樹から生長点付近の組織を長さ 60㎝、直径 15㎝ に調製し、ポリ袋等に密閉して陸路、空路を経由し持ち帰った。未熟果実は受粉後 14 週を目安に登熟程度を確認した後、果房を樹から切り離し、房を適当な大きさに分けポリ袋に密閉して輸送した。また両所で必要に応じて雄花、雌花花房、根、発芽種子等を入手した。

(1)未熟葉を供試した場合

BIOTEK センターの実験室に持ち込んだ未熟葉摘出用試料は、クリーンベンチ前に設置した清潔な台上で 70% エタノールによって表面殺菌した後、外側の葉を１枚ずつ除去した。Ginting ら[6]は、培養に適した未熟葉の葉齢は－７から－10 としているので、これを目安に目的の齢の未熟葉が現れるまで生長の進んだ葉を取り除いた。目的の葉齢の未熟葉を無菌的にクリーンベンチ上に移動し、中肋（midrib）を除いた後、乾燥を防ぐため滅菌紙に包んだ。これら粗調製した未熟葉から速やかに１㎝×１㎝ の外植体（explant）を調製し、培地に置床した。

培養に用いる培地は Murashige らの処方の改変[7]、Nwankao らの処方[8]、Bass らの処方[9]等が用いられている。本実験では基本的に Murashige らの処方[10]を用い、植物生長調節物質、アミノ酸、核酸、蛋白質分解物および活性炭等を添加し、微生物由来ゲル化成分によって固形培地とした。成分を混合した培地は pH を 5.5 に調整した後試験管に分注し、高温高圧の蒸気で滅菌した。

培地に置床した外植体は特定の温度、光条件を維持できる人工気象室にて培養を行い、１、２および３ヶ月後に結果を調査した。

(2)未熟胚を供試した場合

採取、移送した未熟果実はまず果房から個々に分離し、萼等を除いて70%エタノールに浸漬した。次いで果実を緯度方向に2分割し、先端側の核（kernel）内の胚乳（endosperm）を取り出した。この胚乳の最頂部に埋没する形で存在する未熟胚（immature embryo）を傷つけることなく摘出し、培地に置床した。培地および培養条件は未熟葉培養と同様とした。

2.1.2　アブラヤシ組織からのカルス誘導

植物のカルスとは一般的に癒傷組織を示し、組織培養においては組織の性状を呈さない無秩序に増殖する細胞塊ととらえられる。カルスは培養条件によって同じ状態を維持することも葉、根などを再分化することも可能である[4]。したがってアブラヤシのカルスを安定的に誘導することは、これに続く実験に均一な実験材料を提供するという意味において重要である。カルス誘導に影響を及ぼす要因として、培地の組成（基本組成、植物生長調節物質（phytohormone）等)、品種、組織の部位、齢、培養条件（温度、光条件）などが挙げられる。本実験では植物生長調節物質、組織の部位および齢がアブラヤシの未熟葉のカルス誘導に及ぼす影響について調査した。

検討対象以外の培養条件は2.1.1に準じた。

(1) 2,4-D がカルス誘導に及ぼす影響

アブラヤシのカルス誘導に用いられる植物生長調節物質はオーキシン（auxin）類とサイトカイニン（cytokinin）類に分けられ、このうちオーキシンである 2.4-Dichlorophenoxyacetic Acid（以下 2,4-D）がとくに強い影響を及ぼすことが知られている[11]。2,4-D は 1 ppm から 200ppm 以上と広い範囲で用いられており、研究者間で大きく異なっている[12) 13]。そこで本実験ではプランテーション公社で得た 16 年生の樹の未熟葉を用い、我々の研究における 2,4-D 以外の条件にもっとも適した 2,4-D レベルを決定するため、3 ppm から 30ppm の濃度で外植体を培養しカルス誘導を観察した。なお予備的実験でこの範囲外の濃度で外植体は枯死あるいは褐変するのみだったので、本実験では除外した。

(2)葉齢がカルス誘導に及ぼす影響

未熟葉からは 1 回の試料収集で 1,000 以上の外植体が得られるため、一度に大量にカルスが必要な場合や培養条件の決定といった試験に好都合な組織であると考えられていた。しかし実験の進捗にしたがって、未熟葉の齢や部位によってカルス誘導頻度が著しく異なることが明らかになってきた。そこで本実験ではプランテーション公社で得た 16 年生の樹の未熟葉を用い、葉齢－10から－ 6 の 5 齢に分けて外植体を調製、培養し、それぞれのカルス誘導頻度を調査した。

(3)葉部位がカルス誘導に及ぼす影響

培養に適した未熟葉部は生長点の位置から頂部に向かって約 45cm の長さであった。

その未熟葉を垂直方向に15cmの長さに3等分し、基部側から基部、中間部および頂部とし、それぞれ外植体を調製して培養に供した。なおこれより頂部に近い部分は組織がすでに硬化し、培養を行ってもまったく反応がなかった。

2.1.3 アブラヤシカルスからの植物体再分化

カルスは培養条件によってカルスとしての性状を維持したまま増殖を繰り返し、培地を更新することで理論的には永遠に生き続けることができる[4]。カルスの増殖は一般的に通常の組織より増殖が速い場合が多い。一方同じカルスにある種のストレスを与えることによって葉や根などの器官組織を分化させることもできる。これらは、a）植物組織から一旦カルスを誘導し、b）カルスの状態を維持しつつ大量に増やし、c）必要な時点でその一部から植物体を再分化させることによって、均一な性質を持つ植物を大量かつ安定して作り出すmicropropagationシステムの基礎的要件である。そこで本実験では2.1.2で得られたアブラヤシのカルスから植物を再分化する条件を決定するため、おもに培地条件を検討した。

未熟葉を2～3ヶ月間培養して得たカルスを葉組織から分離し、植物生長調節物質の種類と濃度の異なった培地に移植した。移植後1、2ヶ月後にカルスの増殖、組織の分化および褐変の有無など調査した。

2.2 微生物－植物複合系を用いた熱帯油糧作物の形質転換技術

2.2.1 アブラヤシ形質転換の予備的実験

人工的に構築した遺伝子を生物のゲノム（genome）内に組み込み、生物に新たな形質を付与する形質転換の技術は、植物においてはすでに形質転換農産物を生み出すまでとなった[14]。形質転換とそれに付随する遺伝子導入の技術は、実用的方面だけでなく、我々のプロジェクトにある微生物－植物間の相互作用の遺伝子レベルでの機構解明や、ある遺伝子を単離した場合その機能を確認する際などにきわめて有効な手段でもある。植物を形質転換するには、遺伝子を何らかの方法で植物細胞に導入し、ゲノム内に遺伝子が組み込まれた細胞あるいは個体を選抜することが必要である[15]。しかしアブラヤシにおいては、近年形質転換を試みたとの報告は散見されるが[16) 17]、明らかな形質転換体獲得には至っていない。そこで本実験ではアブラヤシの形質転換を最終目的とし、まず組織に遺伝子を導入する手法の確立を目指した。

植物に遺伝子を導入するためには植物細胞のプロトプラスト（protoplast）に穿孔する方法、遺伝子銃を用いる方法（biolistic）といった直接的導入法と、植物病原菌の一種アグロバクテリウム（*Agrobacterium* spp.）の感染力を利用した間接的方法がある。本プロジェクトでは高圧ガスを用いた遺伝子銃法とアグロバクテリウム法を応用する予定である。2.2.2に示すように現在アグロバクテリウム法に用いるベクター（vector）を構築中であるため、本実験では遺伝子銃を用いた方法について検討した。

遺伝子銃は微細な金属粒子表面に目的の遺伝子を附着させ、これをガス圧あるいは電荷で加速し対象とする組織に打ち込み、遺伝子を組織内に導入しようとするシステムであ

る[18]。本方法によれば理論的にはどのような組織へでも遺伝子の導入が可能で、植物ではアグロバクテリウムの感染が難しい単子葉植物に対してとくに有効な手法と考えられている。導入に供したアブラヤシの組織は未熟葉、胚およびカルスとした。また、単子葉植物および双子葉植物の対照としてイネ（*Oriza sativa*）およびキュウリ（*Cucumis sativus*）の葉切片を準備した。射出直前にこれら組織を 1.6% Agarose（Sigma社）を含む培地を注入した 6.5㎝ 径のペトリ皿上に置き、減圧室内に設置した。遺伝子導入の成否を知るために、本実験ではレポーター遺伝子（reporter gene）として大腸菌（*Escherichia coli*）由来の β-D-glucronidase（以下 GUS）遺伝子を用いた。これを直径 1 μm あるいは 1.6 μm の金粒子に附着させ、エタノールにけん濁した状態で用いた。遺伝子銃による遺伝子導入条件の変数は、ガス圧、噴出時間、射出口から試料までの距離（以下射出距離）、減圧度、金粒子量等である。さまざまな条件での射出を試み、レポーター遺伝子の一時的発現（transient expression）の程度で最適条件を決定した。導入処理後の組織におけるレポーター遺伝子の発現の確認は、GUS 酵素が基質 X-glucronide（以下 X-gluc）の呈色反応を触媒する機能を利用した[19) 20) 21)]。

2.2.2 形質転換ベクターの構築

(1)材　　料

形質転換ベクターに必要な要素は、大きく分けてレポーター遺伝子部と選抜マーカー遺伝子部である。これらを含むベクターを構築するため株式会社植物工学研究所からレポーター遺伝子である、GUS 遺伝子を含むプラスミド pIG221[22) 23)]、選抜マーカー遺伝子であるハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド pIZ1 を用いた（図 2）。

また、アグロバクテリウム法に用いるバイナリベクター（binary vector system）構築には、上記に加えて pMM444 を供した。

(2)パーティクルガン法による形質転換用ベクター pIGH1 の構築

ベクター構築および構築後の改良を容易にするため、プラスミド pIG221 の制限酵素認識部位（以下サイト）の変換を行った。まず pIG221 の GUS 遺伝子領域下流に位置する *Eco*RI サイト、および pIZ1 のハイグロマイシン耐性遺伝子領域上流の *Hind*III サイトと下流の *Eco*RI サイトをそれぞれ該当する制限酵素で消化した。Klenow fragment による末端部分の平滑化を行った後、*Bgl*II リンカーをライゲーションすることにより、*Eco*RI および *Hind*III サイトから *Bgl*II サイトへの変換を行った。なお、pIZ1 には *Eco*RI サイトが 2 カ所あり、通常の制限酵素処理では目的のサイトだけが切断された断片を得ることができなかったため、下流の *Eco*RI サイトが先に消化されるような条件を検討した。サイトを変換したベクターは大腸菌 DH5 α 株（以下 DH5 α）に導入し、DH5 α 中で維持した。実験過程中必要な時点で適宜、制限酵素で処理し、目的の制限酵素認識部位の変換、挿入断片長の確認等を行った。

次にサイトの変換を終えた pIZ1 からハイグロマイシン耐性遺伝子領域を切り出し、pIG221 の GUS 遺伝子領域の下流にライゲーションした。これを DH5 α に導入し、選

抜用抗生物質アンピシリンとハイグロマイシンを含む選択培地中で選抜した。選抜されたコロニー、すなわちクローンからベクターを抽出し、制限酵素処理等によって目的の構造を持つことを確認した。

(3)アグロバクテリウム法による形質転換用ベクターの構築

(2)で得たベクターを *Hind*III および *Bgl*II で消化し、GUS 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を含むインサート部分の領域を切り出した。一方 pMM444 を *Hind*III と *Bam*HI で消化し、バイナリーベクターを構成する要素を含む部分を得た。これらをライゲーションの後、DH5α に導入した。これを抗生物質を含む培地上に展開し、目的の構造を持つクローンを選択した。

2.3 熱帯油糧作物からの有用遺伝子単離

2.3.1 植物材料

本研究の全ての植物材料は、プランテーション公社にて栽培管理されているアブラヤシ品種 Marihat の成樹から得た。採取された植物組織は、直ちに液体窒素によって凍結され、ドライアイスに詰め極低温を維持しつつ輸送された。

2.3.2 cDNA ライブラリーの作製

全 RNA の抽出は、Logemann らの方法[24] に従って行った。ただし、抽出液の β－メルカプトエタノール濃度は 100mM に改変した。poly(A)$^+$RNA の精製には、Oligotex-dT30 ＜Super＞（宝酒造）を用いた。cDNA 合成は、受粉後約 18 週の中果皮（mesocarp）組織から抽出した poly(A)$^+$RNA 1 μg を鋳型として、SUPERSCRIPT Choice System（GIBCOBRL 社）を用いて行った。ファーストストランド合成用のプライマーには、Oligo（dT）を選択した。

こうして得られた cDNA は *Eco*RI アダプターを介して λZAPII ベクター（STRATAGENE 社）へ組み込んだ。これらベクターのファージ粒子への包埋は Gigapack II Gold Packaging Extract（STRATAGENE 社）を用いて行い、cDNA 断片を持つ組み換えファージを得た。

2.3.3 ユビキチン cDNA の単離

アブラヤシのユビキチン（ubiquitin）遺伝子の cDNA は、受粉後 18 週の中果皮から作製した約 3 万個の cDNA クローンから、ナタネのユビキチン cDNA[25] をプローブとしたプラークハイブリダイゼーション法[26] によって単離した。

ハイブリダイゼーションを行うメンブランは Hybond N$^+$（アマシャム社）とし、cDNA を UV クロスリンカー（アマシャム社）により固定した。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーション、ならびにシグナルの検出は、化学発光核酸検出システム（Fluorescein Gene Images：アマシャム社）および Hyperfilm MP（アマシャム社）を用いて行った。

ファージクローンのプラスミドクローンへの変換は、*in vivo* Excision 法（λZAPII CLONING KIT の使用説明書に記載）に従って行った。また cDNA の塩基配列は塩基配列解読装置（アプライド バイオシステム社 373A 型）を用い、ダイターミネーター・サイクル・シークエンス法により決定した。

2.3.4 ディファレンシャルスクリーニング

ディファレンシャルハイブリダイゼーションに必要な 2 種のプローブは、受粉後約18週の中果皮および未展開葉から得た。これら組織から抽出した poly(A)$^+$RNA をそれぞれ鋳型に cDNA を合成し、次いで蛍光ラベルによってプローブとした。1 枚のプレートあるいはメンブレン上の組み換えファージまたはプラスミド DNA から 2 枚のレプリカメンブレンを作製し、それぞれ中果皮および未展開葉から作製したプローブと反応させた。プラークおよびコロニーでの選抜においては、2 枚のハイブリダイゼーション結果を比較し、中果皮のプローブとのみ反応したクローンを中果皮特異的に発現するものとして残した。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出方法等は、2.3.3 に準じた。

2.4 熱帯植物－微生物コンソーシアにおける相互作用の分子生物学的解明

2.4.1 *Ganoderma* の観察と採集

アブラヤシの茎ぐされ病（basal stem rot）はパーム油の生産に重大な影響を及ぼす病害の1つであり、その主要な病原菌は *Ganoderma* 属の担子菌類であるといわれている。樹齢 10〜20 年のアブラヤシ農園では40%以上の樹が *Ganoderma* の感染を受けており、パーム油生産最盛期の樹齢 15 年のアブラヤシではパーム油生産量に 80 %以上の損失を被ることも知られている[27]。本病害に対する防除対策は長期的、短期的視点から検討されており、長期的には *Ganoderma* 耐性のアブラヤシの品種改良であり、短期的には病原菌である *Ganoderma* の制御が課題となっている。後者においては、*Ganoderma* の分布調査、遺伝的多様性（genetic diversity）解析、個体群（population）レベルでの性状解析、アブラヤシと病原菌の相互作用の解明など基盤技術の研究が急務である[28]。

本研究はアブラヤシの病原菌である *Ganoderma* の a）インドネシアにおける分布、b）遺伝的多様性の解析、c）感染経路の解析と他の微生物群集との相互作用、d）分子生物学的手法による早期検出システムの構築を目的として今年度からスタートした。

今年度はアブラヤシ組織内に生育する *Ganoderma* の実態調査のためインドネシアに出張し、a）*Ganoderma* 試料の採集、b）種の同定、および c）遺伝的多様性解析のための培養株の取得を試みた。

BSP 社の農園は *Ganoderma* の被害が深刻な北スマトラ州にも広く展開している。しかしアブラヤシの植栽期間が最長で 7 年と短く *Ganoderma* の被害が見られなかったので、近隣のプランテーション公社 No.V（P.T. Plantations No.V）にて感染状態の観察と試料の採取を行った。本農園ではとくに樹齢20年を超えるアブラヤシに *Ganoderma* の感染が見られ、子実体（fruiting body）の発生も確認された。新鮮な子実体を採取して、一部は現地にて培養に供し、他はシリカゲルの中で乾燥し日本に持ち帰った。本農園

で得た菌株名をPTP-V-1およびPTP-V-2とした。

2.4.2 *Ganoderma*の培養

採取された子実体は速やかにBSP社の施設に持ち込み、組織を無菌的に切り出して培地上に接種した。また子実体の切片をペトリ皿の蓋側にワセリンで貼り付け、胞子を培地上に落下させて純粋培養株を取得した。

培地は次の3種類を使用した。

- LCA 培地（三浦培地）：ブドウ糖1ｇ、リン酸2水素カリウム1ｇ、硫酸マグネシウム7水和物0.2ｇ、塩化カリウム0.2ｇ、酵母抽出物0.2ｇ、寒天15ｇ（以上脱塩水1ℓあたり）
- PDA 培地：ニッスイ製
- 麦芽エキス寒天培地：麦芽エキス20ｇ、ペプトン1ｇ、ブドウ糖20ｇ、寒天15ｇ（以上脱塩水1ℓあたり）

子実体を接種したシャーレは輸入許可証『農林水産省指令9横植884号』を取得したうえ日本に持ち帰った。PTP-V-1の子実層の組織からの分離株供試菌株をMCI 3595、PTP-V-2の子実層の組織からの分離株をMCI 3596、同担子胞子からの分離株をMCI 3597とした。

3. 結果および考察

3.1 微生物－植物複合系による熱帯油糧作物の組織培養・大量増殖技術

3.1.1 アブラヤシ組織の準備と調製

熱帯植物の多くは損傷を受けると自己防衛のために傷口から多量のフェノール類等を放出する[29]。反面これらは自らの組織に毒性物質として作用し、組織の活性を著しく低下させる場合がある。組織培養の実験はで組織を小さく調製する機会が多く、切り口の面積は必然的に大きくなる。したがって培養を成功させるためにはまず不要な物質の漏出を抑え、外植体の活性を低下させないことが必要である。摘出されたアブラヤシの組織から不要なフェノール類の放出を抑えるためには、ａ）酸素を遮断し、ｂ）気温以下の一定の温度で、ｃ）できる限り短時間に移動を終了すること、が必要と想定した。

(1)未熟葉を供試した場合

プランテーション公社で試料を収集した場合、樹の伐採から外植体の調製まで約4時間であった。いっぽうBSP社からBIOTEKセンターまでは約1昼夜を要した。これらの試料を培養した結果、BSP社で得た組織からはまったくカルスの誘導が見られなかった（表1）。そこでBSP社において採取地から30分以内の園内の施設に簡易型の無菌設備を持ち込み、農園で採取した試料を直ちに粗調製し、培地に置床した状態でBIOTEKセンターに持ち帰り培養を試みた。その結果、品種や樹齢が異なるためプランテーション公社で得た試料の値と直接比較できないものの、約7％の頻度でカルスの

誘導が確認されたので、移動時間の短縮がカルス誘導に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

(2)未熟胚を供試した場合

未熟胚の培養において、果房の採取1日後あるいは6日後に胚を摘出してカルス誘導に供した結果、両区の間に大きな差は見られなかった（表2）。また、プランテーション公社とBSP社の試料の間には、胚の生存の面で差はなかった。したがって胚培養用の試料を果実の形態で輸送する場合、輸送時間は未熟葉の場合ほど強く影響しないことが示された。

同様な方法で未熟な雄花花房、雌花花房、根を培養したところ、雄花および根から低頻度ではあるがカルスの誘導を確認した。

3.1.2 アブラヤシ組織からのカルス誘導

(1) 2,4-Dがカルス誘導に及ぼす影響

培地上に置床された未熟葉外植体は約2週間で置床時の1.2倍程度に肥大した。この時点で活性を失った外植体は肥大せず組織が半透明となった。カルスはおもに外植体の切り口に生じ、1㎜から4㎜大の球形あるいは紡錘形であった（写真1）。

外植体を6水準の2,4-D濃度の培地で培養した結果、カルス誘導頻度は15ppmまで指数関数的に増加し20ppmを超えると急激に低下した（表3、図3）。15および20ppm 2,4-Dでのカルス誘導頻度は約20%であり、報告されている値と比較してほぼ同水準であった[30]。したがって以後の実験では2,4-D濃度は15ppmとすることに決定した。

(2)葉齢がカルス誘導に及ぼす影響

予備的実験において葉齢－10に満たない未熟葉から得られる外植体数はわずかであり、カルスの誘導頻度は3%以下にとどまった。また、－5より成熟した葉はすでに組織が硬化しており、基部に近いごく一部からのみ外植体が得られた。葉齢－10から－5の6齢の未熟葉を培養した結果を比較したところ、カルス誘導頻度は－6の46.6%を最高に－8、－7および－5で20%に近い値を示した（表4、図4）。

(3)葉部位がカルス誘導に及ぼす影響

アブラヤシの葉は羽状複葉であり、1枚の小葉の長さは30㎝から70㎝で、あたかも1枚の単葉のような形状をなす。葉齢0以下の未展開の状態では、小葉は中肋に沿って頂部に向け折りたたまれている。したがって未熟葉を垂直方向に頂部、中間部および基部に分割すると、基部は小葉基部にあたる部分だけを含み、中間部は小葉基部および小葉中間部、頂部は小葉基部、小葉中間部および小葉頂部を含む。培養を開始して1ヶ月の時点で、基部の外植体は1.5倍から2倍の面積に肥大した。頂部の外植体の多くは葉組織の透明度が下がり細胞が密な様子が観察された。3ヶ月後のカルス誘導頻度を比較

すると、基部が5.8%であったのに対し、中間部および頂部では30%を超える値を示した（表5、図5）。この結果、基部は小葉基部だけを含むので、小葉基部は培養に適さないことが示唆された。しかし中間部および頂部も小葉基部を含んでおり、今回の実験ではこれらの部位において小葉基部がカルス誘導頻度にどのような影響を与えたか判断できなかった。今後さらに詳しい検討が必要である。

また図表には示さなかったが、葉齢ごとに部位を分けた場合、葉齢－6の中間部で82.6%、－7の中間部および頂部、－6の頂部で50%前後というきわめて高いカルス誘導頻度となった。これらの値は既存のいかなる報告より高い値であった。

以上の結果から、培養実験に用いるアブラヤシの未熟葉は葉齢－7から－5の、基部15cmを除いた部位が適当であると判断された。とくに高いカルス誘導頻度が要求される形質転換実験などには、葉齢－6の中間部を用いることが望ましい。

3.1.3 アブラヤシカルスからの植物体再分化

カルスは葉齢－7～－5の未熟葉の基部末端から15cm～45cmの部位から外植体を得、15ppm 2,4-Dを含む培地で培養して2～3ヶ月後誘導されたものを供試した。培地に添加する植物生長調節物質はオーキシン類として2,4-Dおよび α-Naphthaleneacetic Acid（以下 NAA）を、サイトカイニン類として6-Benzylaminopurine（以下 BA）、6-（γ,γ-Dimethylallylamino）purine（以下 2iP）およびZeatinを用いた。

一般的にオーキシン／サイトカイニン値を小さくしたり、植物生長調節物質濃度を相対的に低めることによって、カルスを再分化方向に状態変化させることができる[4]。しかし、オーキシンを5ppm以下の低濃度とした場合、および培地中の植物生長調節物質濃度を徐々に下げるため、活性炭濃度を0.3%とした場合、カルスは短期間のうちに高い頻度で褐変枯死した（表6）。枯死の状態を子細に観察すると、カルスは培地中に黒い物質を放出し、自らも同様の色になっていた。この物質がフェノール類などのストレス誘導物質ならば、本実験に供したカルスでは急激な培養条件変化のストレスが枯死を誘導したと考えられる。

一方カルスの増殖が見られたのは、サイトカイニンの濃度に関わらず15ppm 2,4-Dの区であった（表6）。ほとんどのカルスは紡錘形のまま5mmから10mmの大きさに肥大した（写真2）。また、少数ではあるが不定形の塊状のカルスも見出された。数値は示さなかったが15ppm 2,4-Dおよび20ppm BA添加区において、茎あるいは葉の表面に似た構造を分化したカルスが見られた（写真3）。本実験の結果からアブラヤシのカルスから組織を再分化するには、高い植物生長調節物質濃度を維持し、サイトカイニンの比率を上げることが必要と示唆された。しかし、高い植物生長調節物質濃度は培養過程での変異の引き金ともなり得るので、今後、カルスにストレスなく植物生長調節物質濃度を低下しつつ、効率的に茎葉を分化する条件を検討する。

3.2 微生物－植物複合系を用いた熱帯油糧作物の形質転換技術

3.2.1 アブラヤシ形質転換の予備的実験

レポーター遺伝子を附着させた金粒子を射出導入した組織は、おのおのの組織の最適培養条件で48時間培養した後、X-gluc溶液に浸漬し36℃に保った。導入したGUS遺伝子が細胞内で発現しGUS蛋白を作り出した組織部位では、反応が強い場合、数時間後には濃青色のスポットが確認された（写真4、5）。24時間後にX-gluc溶液を70%エタノールに置換して反応を停止し、肉眼で確認できる青色スポットを計数した（表7）。

本実験で供試したアブラヤシの未熟葉、カルス、胚、イネ第1本葉およびキュウリ子葉のいずれにおいても、レポーター遺伝子の発現が確認された。青色スポットの大きさと色の濃さが遺伝子発現の強さに比例すると仮定した場合[19]、アブラヤシの未熟葉および胚におけるGUS遺伝子の発現はイネおよびキュウリのそれより強いと見られた。したがって今後遺伝子の発現や形質転換を確認するために用いるレポーター遺伝子として、GUS遺伝子は有効であると判断された。

遺伝子銃で植物組織に遺伝子を導入し、形質転換体を得ようとする場合、植物細胞の損傷を最小限に抑えつつ、表皮細胞から3、4層目以上の細胞層に粒子を到達させることが必須である[31]。アブラヤシの未熟葉に遺伝子を導入する射出条件を詳細に検討した結果、射出距離および減圧度が大きく影響し、ガス圧、噴出時間および金粒子の大きさの影響は小さいことが明らかとなった（表6）。射出距離が6cmより近い場合、あるいは減圧度が500mmHg以下の場合、試料の射出点直下の部分が損傷を受け細胞が死んだ様子が確認された。一般的に細胞の深層に粒子を到達させるには、粒子をできる限り1粒子に近い状態で、高い速度で射出することが必要であり、そのためにはガス圧を上げ、噴出時間を長くとり、射出距離を短縮する等で対応する。アブラヤシ未熟葉組織ではとくに射出ガスと金粒子の溶媒であるエタノールが直接試料に影響しない条件を設定する必要性が示された。

カルスへの導入実験では、未熟葉の場合より高いガス圧あるいは短い射出距離で青色スポットが多く確認された。これは、供試したカルス表面近傍の細胞の活性が葉組織より低いか、あるいは細胞壁などの表面構造が異なるためと考えられた。

以上の結果から、組織ごとに最適の射出条件を決定することによって、遺伝子銃を用いたアブラヤシ組織への遺伝子導入が可能であることが示された。今後、レポーター遺伝子による形質転換に適した遺伝子導入条件と、3.3で単離を進めている遺伝子の機能を解析するための遺伝子導入および遺伝子発現検定方法を検討する。

3.2.2 形質転換ベクターの構築

(1)パーティクルガン法による形質転換用ベクター pIGH1 の構築

pIZ1には*Eco*RIサイトが2カ所あり、通常の制限酵素反応系ではハイグロマイシン耐性遺伝子の内側にある*Eco*RIサイトで切断される傾向がとくに強かったので、部分消化を試みても目的の下流側サイトのみでの切断が不調であった。そこで制限酵素によるプラスミドの切断点認識の傾向を変えるため、反応系に臭化エチジウムを加える手法

を試み、臭化エチジウムの濃度や制限酵素の反応温度などの条件を検討した。その結果、臭化エチジウムを最終濃度20mg／mℓで加え、37℃で5～7分間反応させる条件が最も適当であり、下流側の*Eco*RIサイトでのみ切断された目的の断片を得ることができた。

pIG222のGUS遺伝子領域の下流に、pIZ4から切り出したハイグロマイシン耐性遺伝子を含む領域をライゲーションし、DH5αに導入後、アンピシリンとハイグロマイシンを含む選択培地中で選択した。しかし、通常選抜に使用される抗生物質濃度[32]の培地では確実な、クローンの選抜ができなかった。そこで、ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入されていないクローンは確実に生存できず、かつ遺伝子の導入されているクローンは生存できるような抗生物質の濃度をあらためて検討したところ、ハイグロマイシン濃度を通常より上げることで選抜が可能となった。

以上のような条件で最終的に目的の構造を持つベクターを得、pIGH1と命名した。図6に制限酵素地図を示す。

(2)アグロバクテリウム法による形質転換用ベクターの構築

形質転換用ベクターpIGH1は制限酵素*Bgl*IIサイトをGUS遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子部位の内側と外側の2個所持つため（図6）、まずで*Bgl*IIで部分消化を行い、次いで*Hind*IIIで完全消化して両遺伝子を含む断片を得た。これをバイナリベクターpMM444のクローニングサイトにライゲーションし、大腸菌に形質転換した。現在目的の構造を持つと思われるクローンが得られており、今後その構造を解析する。

3.3 熱帯油糧作物からの有用遺伝子単離

3.3.1 cDNAライブラリーの作製

ヤシ油の生合成は受粉後約16週を経過した果実の中果皮組織で始まり、約18週目にそのピークを迎える。我々は、パーム油の生合成に関与する遺伝子および果実の成熟過程で重要な働きをする遺伝子を単離することを目的として、受粉後18週の中果皮組織をcDNAライブラリー作製の材料として選んだ。

その結果、当該組織から調製したpoly(A)$^+$RNA 1 μgから約210万個の独立したクローンを含むライブラリーを得た。X-galおよびIPTGを添加した寒天培地上で形成される青色プラークの割合は約5％であり、無作為に選んだ白色プラーク12個は全て0.6kbのインサートを持っていた。また、これらのインサートDNAの平均は約1.1kbであった。したがってここで作製されたライブラリーは、構成するクローン数、非組み換え体の出現頻度およびcDNAの平均長の点で、所期の目的を達成するために十分なものであると判断した。

3.3.2 ユビキチンcDNAの単離

ユビキチンの発現様式は一般に構成的（constitutive）であり、その発現レベルもきわめて高いことが知られている。したがって、そのプロモーターは形質転換によって外来遺伝子を構成的に、かつ高発現させることが求められる場合において、とくに利用価値が高

いと推測された。近年、トウモロコシ（*Zea mays*）から単離されたユビキチンのプロモーターがアブラヤシにおいても高発現することが報告された[33]。また、ユビキチンは生物に普遍的に存在し、その一次構造もよく保存されていることから、ある植物において得られている遺伝子をプローブとして他の植物から容易に単離できると考えられた。我々は、ナタネから単離されたユビキチン cDNA をプローブとしたプラークハイブリダイゼーション法により、アブラヤシ cDNA ライブラリーから新規のユビキチン遺伝子の獲得を試みた。

受粉後約 18 週の中果皮組織から作製した cDNA ライブラリーの約 3 万個のプラークを選抜に供したところ、12 個のポジティブクローンが得られた。これらクローンの cDNA についてインサート DNA の長さを調べたところ、約 1.6kb からなるクローン（UBQ11）が最長であった。UBQ11 について塩基配列の決定を進めた結果、これまでに終了した約 90% の塩基配列から推測される 394 アミノ酸残基のうち、イネのユビキチン遺伝子[34] のそれと異なるのはわずかに 1 アミノ酸残基であった。したがって UBQ11 は、イネと同様に 6 個のタンパク質ユニットを含む、アブラヤシのポリユビキチンをコードする完全長鎖のクローンであると推定された（図 7）。

今後、全塩基配列を決定し、プローモーター領域の単離および機能の確認を行う予定である。

3.3.3 中果皮特異的に発現する cDNA の単離

我々は、パーム油生合成の場である果実の成熟過程において重要な働きを担う遺伝子を単離する手段として、中果皮組織で特異的に発現している遺伝子の単離、解析を進めている。これらの遺伝子の中には、果実の主貯蔵物質である脂質の生合成に関わる酵素をコードしたものだけでなく、菌類が果実へ侵入するのを防ぐために働いているものなどが含まれていると期待している。

cDNA ライブラリーの選抜は、受粉後 18 週の中果皮および未展開葉組織からそれぞれ調製した cDNA をプローブとして用いたディファレンシャルハイブリダイゼーション法によって行った。一次選抜の結果、未展開葉から調整した cDNA プローブとは反応せず、中果皮から調製したものと特異的に反応する 42 クローンを選抜した（表 8）。さらに、これらは二次選抜、シングルプラーク選抜、ならびにプラスミドクローンへ変換した後のコロニー選抜を経て、25 クローンに絞り込まれた。次に、*Eco*RI アダプター内に存在する制限酵素 *Sal*I サイトを利用してインサート DNA の長さを調べた結果、類似した切断パターンをもつものが見られた。これらは、同一またはきわめて類似した mRNA に由来する可能性が高いと考えられる。

今後は選ばれた 25 クローンについて塩基配列の部分決定を行って、同一 mRNA 由来の cDNA を持つ重複クローンを除き、さらに残った候補について、ノーザンブロット等による発現の特異性の検定を行う予定である。果実の成熟過程に対応した発現様式が見られる cDNA については、全塩基配列を解読し、それらの類似性に関するデータベース検索を試みる予定である。

3.4 熱帯植物－微生物コンソーシアにおける相互作用の分子生物学的解明

3.4.1 *Ganoderma* の観察と同定

農園管理者によると、北スマトラ州一帯ではすでに農園全体の約 50% の面積の土壌に *Ganoderma* がすでに侵入していると推定されている。土壌を通して *Ganoderma* に感染したアブラヤシは樹冠部の葉が上向きに放射状に開裂せず、萎れて垂れ下がる徴候を示した（写真 6 ）。感染が進行すると幹の内部から全体に腐敗が進み、組織の柔らかい樹冠部が脱落し枯死に至っていた。*Ganoderma* の子実体は感染の進んだ樹、あるいは枯死した樹の地表近くの幹上に集中的に発生していた（写真 7 ）。

(1)形態的性状

傘は半円形～扇形で、無柄または短い柄を側面に持ち、大きさは 5 ～10㎝ 程度であった。傘の表面は赤褐色～栗色～黒褐色を呈し、浅い環溝と放射状の弱い畝を有した。さらに黒色で明瞭な殻皮に覆われており、全体に漆を塗った様な感じでつやがあった（写真 8 ）。傘の裏面は平らで、生長の旺盛な部分は白色を呈するが、古い組織部分は緑灰白色に変わった。裏面を実体顕微鏡で観察すると、小さな孔が一面に生じている様子が確認された（写真 9 ）。

傘の断面を見ると肉はコルク質状で濃いタバコ色を呈し、厚さは 1 ㎝ 前後であった。上面の殻皮はよく発達し、棍棒状の菌糸の先端が直立並列して柵状組織様構造を呈した。下面は灰白色の管孔構造からなり、管孔長は 1 ㎝ 前後であった（写真10)。

胞子は細長い楕円形で一端は裁断形をなし、大きさは長軸 11～12.5 μm、短軸 5 ～ 6 μm であった。胞子膜は内外 2 層からなり、外膜は薄く、内膜は厚膜でやや不明瞭なイボ状突起を有し、褐色を呈した（写真11)。

(2)培養上の性状

LCA、PDA、および麦芽エキス寒天培地上でのコロニーの生育は迅速であった。PDA 培地上でのコロニーは初め白色で後にやや灰白色に変化し、形状はビロード状を呈し放射状の皺を有した（写真 12)。この色調の変化は子実体の裏面のそれと同様であった。コロニー裏面は初め白色で、後に橙に変色した。顕微鏡観察によると菌糸は明瞭なかすがい連結構造を有した（写真 13)。

(3)分類学上の知見

Ganoderma 属に近縁な属として *Elfingia*、*Trachyderma* 属が知られている。これらの菌類は胞子が卵形～楕円形を有し、一端は裁断状である。また胞子膜は二重で、外膜は薄く無色、内膜は黄褐色で細かいイボ状突起を有するという共通性状を持つ。これに対して *Ganoderma* は傘の表面に柵状組織様の殻皮を持つという特徴から、*Elfingia* や *Trachyderma* 属から区別されている。今回採取した菌株（PTP-V-1、2）は胞子の性状、傘の組織性状から *Ganoderma* 属に帰属することが判明した。

Jean-Marc Moncalvo らによれば、現在 *Ganoderma* 属には 385 種が記載されてい

る[35]。PTP-V-1、2の子実体の観察結果から、この *Ganoderma* は、Adaskaveg ら[36]によって提唱された *Ganoderma lucidum*-complex に含まれる種と推定され、この complex を構成する種と対比した。その結果 PTP-V-1 および 2 は *G. boninense* の菌学的性状とよく一致したので、これら菌株は *G. boninense*（和名シママンネンタケ）と同定された（表9）。

マレーシアにおいては、アブラヤシの病原菌として *Ganoderma lucidum*、*G. boninense*、*G.miniatocinctum*、*G. chalceum*、*G. tornatum*、*G. xylonoides*、ならびに *G. zonatum* の7種の *Ganoderma* 属が報告されている[37]。一方、インドネシアにおいては、*G. zonatum* の1種のみが報告されている[38]。伊藤[39]によれば、*G. zonatum* は *G. boninense* の異物同名（synonym）として扱われており、本実験で得られた *G. boninense* は1914年 Lloyd によってすでにインドネシアから報告された種と同一である可能性が高いといえる。今後、まず PTP-V-1、2菌株から純粋培養系を作り、これらを材料にアブラヤシへの感染能力に特異的な遺伝子マーカーを得る予定である。

4. 結　　語

平成9年度は本プロジェクト推進の足がかりを作るため、インドネシア出張を中心にして基盤となる技術の開発に取り組んだ。とくに組織培養による植物体再生系の確立は重要な技術の一つである。マレーシア・パーム油研究所（PORIM、Palm Oil Research Institute of Malaysia）では、1980年代に優良品種のクローン苗の栽培を試みたが、再生植物体の雄花、雌花に異状が認められ、商業的に用いる技術開発までにはいたらなかった。現在でも、その変異の原因を追求する研究が進められている。このような現状をふまえると、本研究ではいかにして変異の起きない培養系を確立するかが最終的なプロジェクト成否の鍵となる。この目標を達成するには、2,4-D など植物生長調節物質の濃度やその施用時期、あるいは合成植物生長調節物質以外の生物－とくに微生物－由来の物質を代替として用いることを検討する必要がある。今年度、カルス誘導のための組織の選定や誘導条件が設定できたので、来年度はカルスから器官を分化する条件を決定し、さらに幼植物まで再生させるシステムを確立したい。

形質転換系については、単子葉、双子葉植物を問わず種々の方法が応用されている。しかし、アブラヤシのような多年生植物に外来遺伝子を導入した例はきわめてまれである。本研究ではアグロバクテリウムを介した形質転換系を確立し、高頻度で遺伝子導入が可能となる技術を開発する予定である。その予備的実験として、遺伝子銃による遺伝子導入と導入された遺伝子の一時的な発現を調べた。未熟胚や未熟葉において、充分に強いレポーター遺伝子の発現が確認されたので、アグロバクテリウムの感染が可能となれば、導入遺伝子も効率よく発現すると予想される。本研究ではハイグロマイシン耐性遺伝子とレポーター遺伝子を同時に有するベクターを開発したので、来年度はこのベクターを含むアグロバクテリウムの感染方法を検討する予定である。アブラヤシは本来アグロバクテリウムの宿主ではないので、感染効率を高めるために、バクテリアの *Vir* 遺伝子の活性化などに工夫が必要となる。過去に報告のあるフェノール化合物など活性因子を添加し、感染効率

を検討したい。

パーム油生産の重要な器官は果実の中果皮と呼ばれる果肉組織である。この中果皮細胞に注目し、脂肪酸生合成や中果皮組織内での遺伝子発現を解析するために、受粉後 18 週の中果皮組織から mRNA を単離し、cDNA ライブラリーを作製した。またユビキチン遺伝子は過去の情報から構成的に高発現していると予想されたので、ナタネのユビキチン cDNA をプローブとしたプラークハイブリダイゼーション法を用いて遺伝子のスクリーニングを試みた。来年度は中果皮組織から得た cDNA ライブラリーを活用し、ユビキチン遺伝子を含め、構成的に高発現している遺伝子あるいは果肉組織特異的に発現している遺伝子の単離と解析を行う予定である。

植物－微生物複合系の解析としてアブラヤシ病原菌（*Ganoderma*）の採取と同定を行った。アブラヤシに感染し病害を引き起こす *Ganoderma* は *G. boninense* や *G. lucidum* など 7 種が知られており、今回採取された菌は形態的観察から全て *G. boninense* であった。来年度は菌の純粋培養系を作り、その培養菌を用いて感染特異的な遺伝子マーカーを特定する予定である。またアブラヤシ組織への *Ganoderma* の人工感染を試み、遺伝子マーカーによって感染が確認できれば、感染組織から cDNA ライブラリーを作製する。最終的には、このライブラリーから感染によって誘導される防御遺伝子を単離し、そのメカニズムを分子生物学的に解析する予定である。

5. 参考文献

1) 岩佐俊吉, 熱帯の有用作物, (財)農林統計協会, 395-402, 1975.

2) Piggott, C.J., Growing oil palm (An illustrated guide), The Incorporated Society of Planters, 19-36, 1990.

3) Hartley, C.W.S., The oil palm, Longman Scientific & Technical, Third edition, 1988.

4) 原田宏, 駒嶺穆, 植物細胞組織培養 (実際・応用・展望), 理工学社, 1979.

5) Duval, Y., Engelmann, F., Durand-Gasselin, T., Ⅲ.7 Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Biotechnology in Agriculture and Forestry vol 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed Ⅰ, 30, 335-352, 1995.

6) Ginting, G., Subronto, M. (Indonesian Oil Palm Research Institute) からの私信.

7) Rabechault, H., Martin, J.-P., Vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis*) by means of leaf tissue culture, C.R.Acad. Sc. Paris. Ser. , 283, 1735-1737, 1976.

8) Nwankwo, B.A., Krikorian, A.D., Morphogenetic potential of embryo-and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc., Ann. Bot., 51, 65-76, 1983.

9) Bass, A., Hughes, W., Condition for isolation and regeneration of viable protoplasts of oil palm (*Elaeis guineensis*), Plant Cell Reports, 3, 169-171, 1984.

10) Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol.Plant., 15, 473-497, 1962.

11) Wooi, K.C., Ⅳ 12 Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): Tissue Culture and Micropropagation, Biotechnology in Agriculture and Forestry vol 10. Legumes and Oilseed Crops Ⅰ, 10, 569-592, 1990.

12) Duval, Y., Rival, A., Verdeil. J.L., Buffard-Morel, J., Advances in oil palm and coconut micropropagation, Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics: proceedings of the Southeast Asian regional workshop, 106-118, 1993.

13) de Toucher, B., Duval, Y., Pannetier, C., Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Plant Cell Reports, 10, 529-532, 1991.

14) 日野明寛, 遺伝子組換え農作物の開発の現状, 日本油化学会誌, 46(10), 1289-1297, 1997.

15) Potrykus, I., Gene transfer to plants: assessment and perspectives, Physiol. Plant., 79, 125-134, 1990.

16) Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W.Y., Sijot, S.Z., Muad, M.R., The

development of genetic transformation methods for oil palm improvement, Abstracts of 5th international congress of plant molecular biology, 336, 1997.

17) Shahabuddin, H., Abdullah, R., Shah, F.H., Construction of vectors for transformation of the fatty acid biosynthetic pathway in oil palm *via* the biolistic method, Abstracts of 5th international congress of plant molecular biology, 1997.

18) 森川弘道, 大江田憲治, 長澤秋都, 島田多喜子, 児玉浩明, 松岡信, 西原昌宏, 関原明, 特集　パーティクルガンによるトランスジェニック生物, 月刊　組織培養, 20(9), 321-351, 1994.

19) Jefferson, R.A., Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Molecular Biology Reporter, 5(4), 387-405, 1987.

20) Gallagher, S.R., GUS Protocols, Academic Press Inc., 1992.

21) 村上高, 大橋祐子, 形質転換植物の組織切片中における GUS レポーター遺伝子発現の検出法, 植物細胞工学, 4(4), 281-286, 1992.

22) Tanaka, A., Mita, S., Ohta, S., Kyozuka, J., Shimamoto, K. and Nakamura, K., Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. Nucleic Acid Research, 18(23), 6767-6770, 1990.

23) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K., Construction and expression in tobacco of a b-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiology, 31(6): 805-813,1990

24) Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L., Improved method for the isolation of RNA from plant tissues, Anal. Biochem., 163: 16-20, 1987.

25) Murase, M., Harada, J.J., Unpublished result, 1991.

26) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

27) Sariah, M., Hussin, M. Z., Miller, R.N.G., Holderness, M., Plant Pythology, 43, 507-510, 1994.

28) Darmono, T.W., Suharyanto, Recognition of field materials of *Ganoderma* sp. associated with basal stem rot in oil palm by a polyclonal antibody, Menara Perkebunan, 63(1), 15-22, 1995.

29) 高杉光雄, 植物のポリフェノールと自己防衛機構, 日本農芸化学会誌, 69(9), 1185-1188, 1995.

30) Teixeira, J.B., Sondahl, M.R., Kirby, E.G., Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm, Plant Cell Reports, 13, 247-250, 1994.

31) 飯田朝子, 山下稔哉, 服部悦子, 森川弘道, 実験講座　遺伝子導入実験法 1 , パーティクルガン法, 植物細胞工学, 4(1), 43-48, 1992.

32) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Chapter 1, 1989.
33) Chowdhury, M.K.U., Parveez, G.K.A., Saleh, N.M., Evaluation of five promoters for use in transformation of oil palm (*Elaeis guinnensis Jacq.*). Plant Cell Reports, 16, 277-281, 1997.
34) Huq, E., Hirayama, L., Hossain, M.A., Hodges, I.K. Characterization of a cDNA encoding a polyubiquitin gene in rice, Plant Physiol., 113, 305, 1997.
35) Jean-Marc Moncalvo & Ryvarden, L., A nomenclatural study of the *Ganodermataceae*, Donk. Synopsis Fungorum, 11, 114, Fungiflora-Oslo-Norway, 1997.
36) Adaskaveg, J.E. & Gilbertson, R.L., Basidiospores, Pilocystidia, and other basisiocarp characters in several species of the *Ganoderma lucidum*-complex. Mycologia, 80(4): 493-507, 1988.
37) Steyaert, R.L., Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogoar and Leiden herbaria, Persoonia, 7: 55-118, 1972.
38) Lloyd, C.G. Mycological Writings 1-7, Cincinati, Ohio, 1898-1925.
39) 伊藤誠哉, 日本菌類誌, 養賢堂, 341-346, 1955.

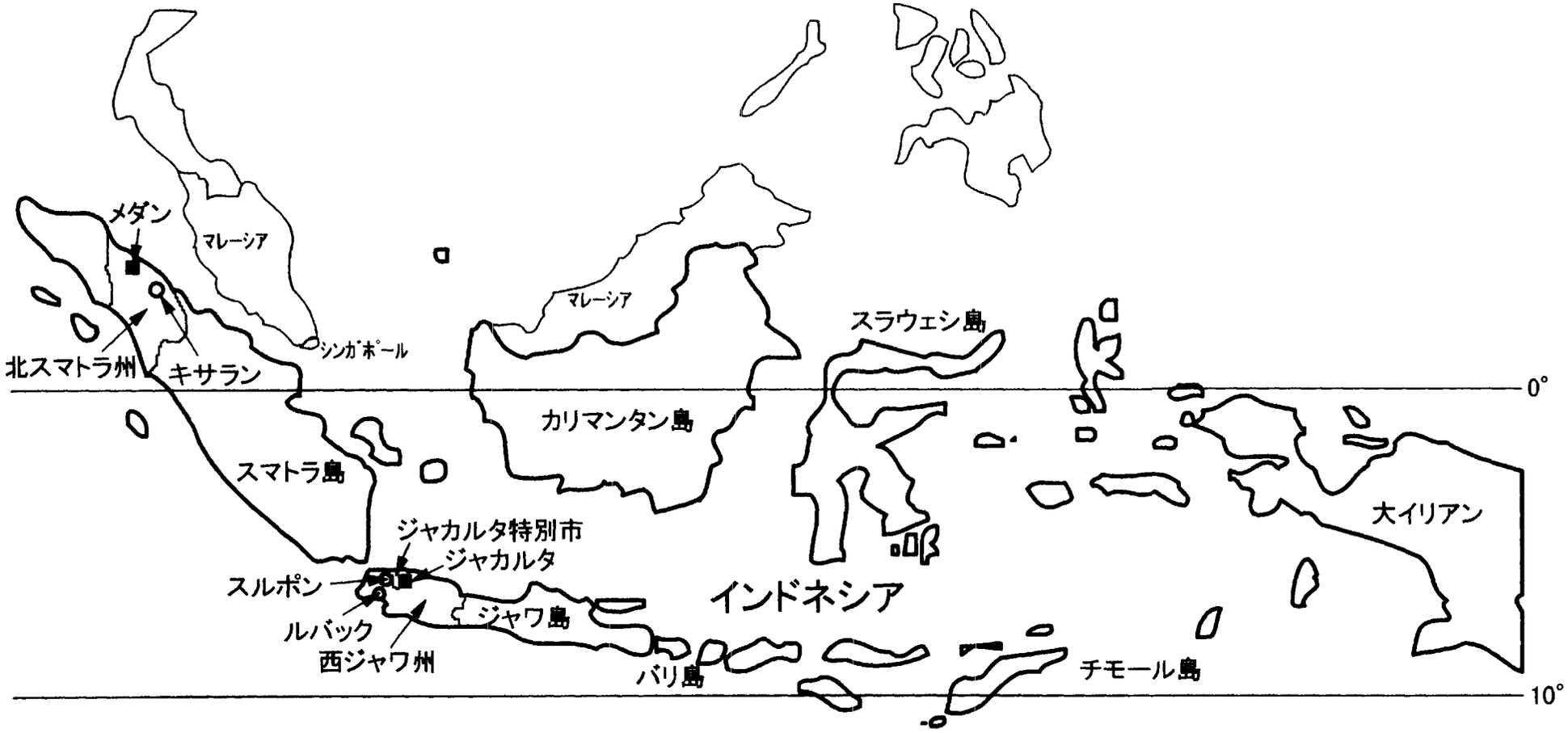
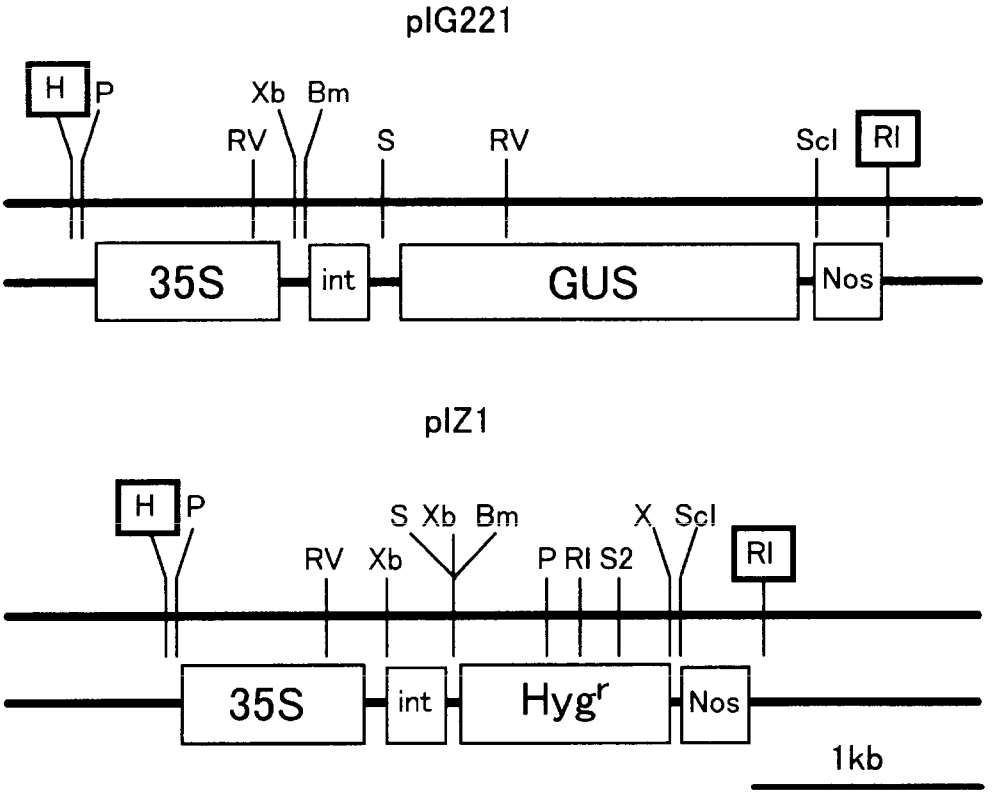


図1　インドネシア共和国の国土と本プロジェクトに関係する場所



□ *Bgl*II 認識部位に変換された部位
35S : カリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子のプロモーター、int : ヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロン、GUS : β-glucronidase 遺伝子、Hyg^r : ハイグロマイシン耐性遺伝子、Nos:ノパリン合成遺伝子のターミネーター
制限酵素認識部位 Bm : *Bam*HI, Bg : *Bgl*II, RI : *Eco*RI, RV : *Eco*RV, H : *Hind*III, P : *Pst*I, S : *Sal*I, ScI : *Sac*I, S2 : *Sac*II, Xb : *Xba*I, X : *Xho*I.

図 2　形質転換用ベクターの作製に用いたベクター pIZ 1 および pIG221 の制限酵素地図

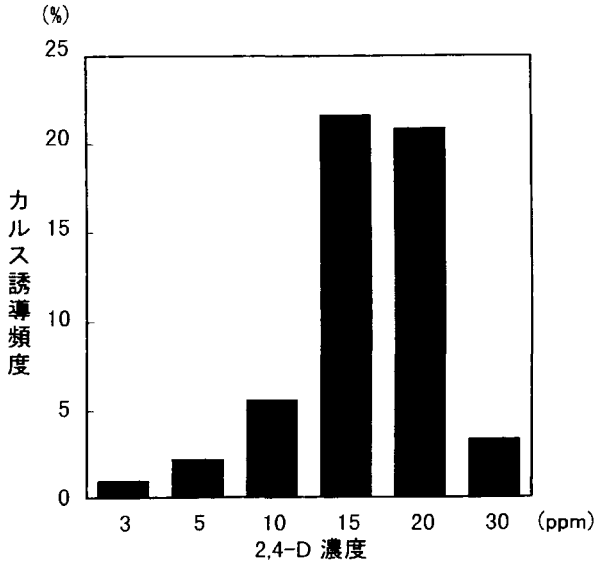


図3　培地に添加する 2,4-D 濃度がアブラヤシ未熟葉からのカルス誘導に及ぼす影響

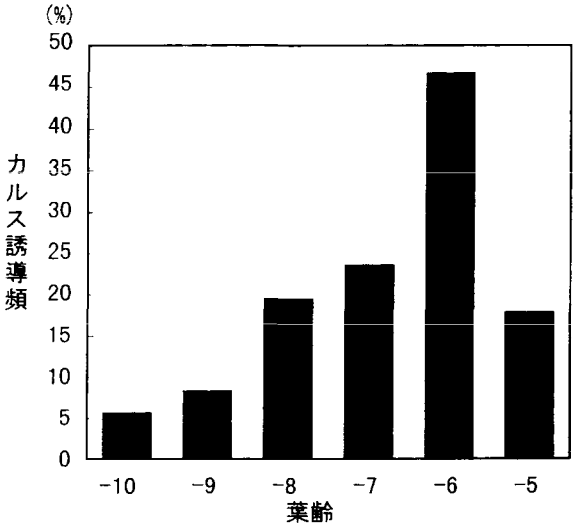


図4　未熟葉の齢がアブラヤシのカルス誘導に及ぼす影響

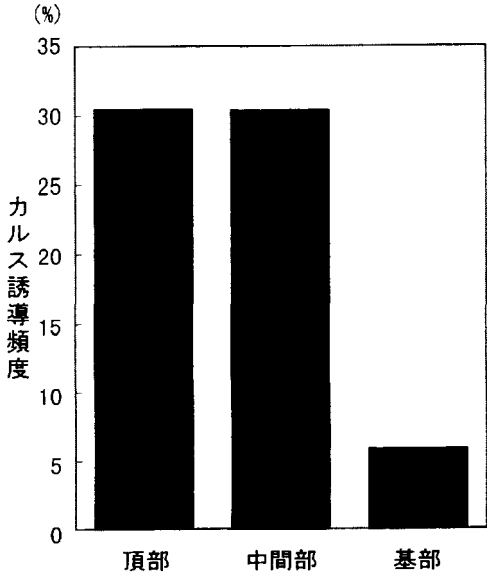
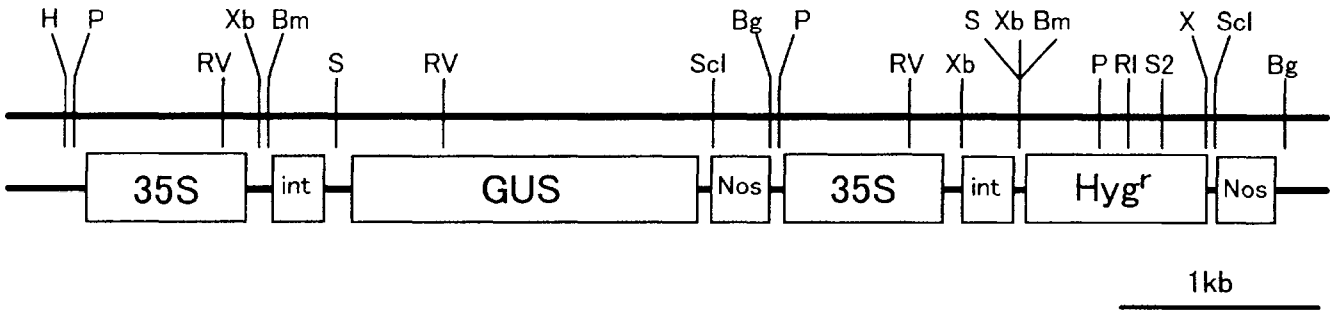


図5　未熟葉の部位がカルス誘導に及ぼす影響



35S : カリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子のプロモーター、
int : ヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロン、GUS : β-glucronidase 遺伝子、
Hyg^r : ハイグロマイシン耐性遺伝子、Nos:ノパリン合成遺伝子のターミネーター
制限酵素認識部位 Bm : *Bam*HI, Bg : *Bgl*I, RI : *Eco*RI, RV : *Eco*RV, H : *Hind*III, P : *Pst*I, S : *Sal*I, ScI : *Sac*I, S2 : *Sac*II, Xb : *Xba*I, X : *Xho*I

図 6　形質転換用ベクター pIGH 1 の制限酵素地図

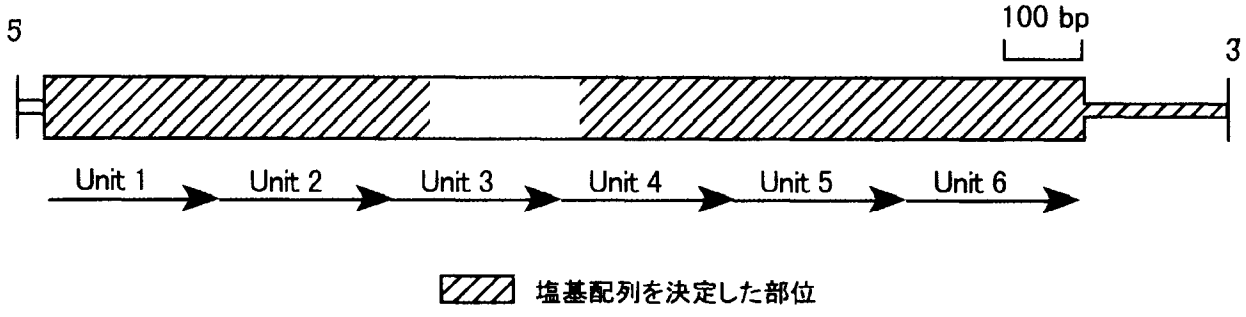


図 7　アブラヤシのユビキチン cDNA（UBQ11）の基本構造

表1　試料採取地と移動時間がアブラヤシ未熟葉培養におけるカルス誘導に及ぼす影響

採取場所[1)]	試料輸送時間[2)]	培養外植体数	カルス誘導外植体数	カルス誘導頻度（%）
プランテーション公社	3.0	5,078	1,097	21.6
BSP社	26.0	182	-	-
BSP社	0.5	2,219	153	6.9

1）プランテーション公社では品種 Marihat の16年生樹から、BSP社では品種 Lonsum の 5 年生樹から試料を採取した。
2）試料の輸送は通気を遮断し気温以下にて行った。

表2　果実試料採取地と保存日数がアブラヤシ未熟胚培養におけるカルス誘導に及ぼす影響

採取場所[1)]	果実保存日数[2)]	培養胚総数	生存胚数（頻度%）	カルス化胚数（頻度%）	肥厚胚数（頻度%）
プランテーション公社	1	55	53 (96)	38 (69)	0 (0)
プランテーション公社	6	62	59 (95)	38 (61)	0 (0)
BSP社	2	77	77 (100)	0 (0)	77 (100)

1）プランテーション公社では品種 Marihat の16年生樹から、BSP社では品種 Lonsum の 6 年生樹から試料を採取
2）果実の保存は通気を遮断し室温にて行った。

表３　培地に添加する 2,4-D 濃度がアブラヤシ未熟葉からのカルス誘導に及ぼす影響

2,4-D 濃度 (ppm)	培養 外植体数	カルス誘導 外植体数	カルス誘導頻度 (%)
3	631	6	0.95
5	45	1	2.22
10	736	41	5.57
15	5,078	1,097	21.60
20	120	25	20.83
30	119	4	3.36

表４　未熟葉の齢がアブラヤシのカルス誘導に及ぼす影響

葉齢	培養 外植体数	カルス誘導 外植体数	カルス誘導頻度 (%)
−10	90	5	5.56
−9	529	44	8.32
−8	779	151	19.38
−7	791	186	23.51
−6	431	201	46.64
−5	259	46	17.76

表５　未熟葉の部位がカルス誘導に及ぼす影響

部位	培養 外植体数	カルス誘導 外植体数	カルス誘導頻度 (%)
頂部	749	228	30.44
中間部	731	222	30.37
基部	653	38	5.82

表6　培地組成がアブラヤシ未熟葉由来カルスの増殖に及ぼす影響

オーキシン濃度(ppm)		サイトカイニン濃度(ppm)			活性炭濃度	供試	増殖カルス		枯死カルス	
2,4-D	NAA	BA	2-IP	Zeatin	(%)	カルス数	カルス数	割合(%)	カルス数	割合(%)
15.0		1.5			0.10	124	67	54.03	32	25.81
15.0		20.0			0.10	119	61	51.26	33	27.73
5.0		5.0			0.30	82	18	21.95	58	70.73
15.0		5.0			0.30	124	34	27.42	76	61.29
	0.5	2.0			0.10	43	0	−	36	83.72
	2.0	10.0			0.10	41	0	−	38	92.68
	1.0	5.0			0.10	75	17	22.67	58	77.33
	5.0	10.0			0.10	81	16	19.75	65	80.25
0.2			3.0	1.0	0.15	78	12	15.38	66	84.62

表7　遺伝子銃の射出条件がアブラヤシ組織へのGUS遺伝子の導入に及ぼす影響

組織	ヘリウムガス圧 (kgf/cm^2)	減圧度 (mmHg)	ガス噴出時間 (秒)	金粒子直径 (μm)	射出口－試料距離 (cm)	試料当りの平均青色スポット数[1)]
未熟葉	3.0	600	0.05	1.0	6	30
	3.0	600	0.05	1.0	7	82
	3.0	600	0.05	1.0	8	121
	3.0	600	0.05	1.6	6	68
	3.0	600	0.05	1.6	8	101
	3.5	600	0.05	1.0	8	76
	4.0	600	0.05	1.0	8	137
	4.0	600	0.05	1.6	4	96
	4.0	600	0.05	1.6	6	100
	4.0	600	0.10	1.6	6	114
	4.0	600	0.10	1.6	8	107
	4.0	500	0.10	1.6	8	62
カルス	3.0	600	0.05	1.6	8	8
	4.0	600	0.05	1.6	8	29
	4.0	600	0.10	1.6	6	82
	4.0	600	0.10	1.6	8	33
胚	3.5	600	0.05	1.6	8	149

1）射出48時間後の試料をX-gluc溶液に浸漬し、24時間後に計数した。

表８　アブラヤシ果肉特異的に発現する遺伝子の選抜

No.	一次選抜		二次選抜		精製プラーク選抜		コロニー選抜		cDNA サイズ[3]
	シグナル強度[1]	特異性[2]	シグナル強度[1]	特異性[2]	シグナル強度[1]	特異性[2]	シグナル強度[1]	特異性[2]	(kbp)
1	+++	MS	+++	MS	++++	MS	+++	MS	2.2
2	+++	MS	+++	MS	++++	MS	+++	MS	2.2
3	+++	MS	+++	MS	+++	MS	+++	MS	2.2
4	+++	MS	++	MS	++	MS	+++	MS	0.6,0.6
5	+++	MS	++	MS	++++	MS	++	MA	
6	++	MS	++	MS	++	MS	+++	MS	2.4
7	++	MS	++	MS	++	MS	+++	MS	0.6,0.6
8	++	MS	++	MS	++	MS	+++	MS	0.6,0.6
9	++	MS	++	MS	+	MS	+++	MS	0.6,0.6
10	++	MS	++	MS	++	MS	+++	MA	
11	++	MS	++	MS	++	MS	++	MA	
12	++	MS	++	MS	++	MS	+++	MA	
13	++	MS	+++	MS	++	MS	++	MA	
14	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	1.05
15	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	0.6,0.6
16	++	MS	+	MS	+	MS	++	MS	0.6,1.2
17	++	MS	+	MS	++	MS	++	MS	0.6
18	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	0.6,0.6
19	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	1.6
20	++	MS	++++	MS	+	MS	++	MS	0.6,0.7
21	++	MS	++	MS	+	MS	++	MA	
22	++	MS	++	MS	++	MS	++	MA	
23	++	MS	+	MS	++	MS	++	MS	0.6,0.6
24	++	MS	−	ND					
25	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	
26	++	MS	+	MS	++	MS	+	MA	
27	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	0.6,0.7
28	++	MS	++	MS	−	MS			
29	++	MS	++	MS	++	MS	++	MA	
30	++	MS	++	MS	+	MS	+++	MS	0.6,0.6
31	++	MS	+	MS	−	ND			
32	++	MS	−	ND					
33	++	MS	++	MS	+	MS	+	MA	
34	++	MS	+	MS	+	MS	++	MS	0.6
35	++	MS	++	MS	+	MS	++	MA	
36	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	0.8
37	++	MS	++	MS	−	ND			
38	++	MS	++	MS	+	MS	++	MS	0.7
39	++	MS	++	MS	+	MS	+++	MS	0.55
40	++	MS	++	MS	+	MS	++	MS	0.6,0.6
41	++	MS	++	MS	+++	MS	++	MS	0.6,0.6
42	++	MS	++	MS	++	MS	++	MS	0.6,0.6

1）++++:強、 +++:中、 ++:弱、 +:微、 −:検出不可
2）MS:果肉特異的、 MS:果肉で多い、 ND:判定不能
3）制限酵素 Sal I により切り出された断片をゲル電気泳動にて解析した結果。

表 9　*Ganoderma lucidum*-complex 菌種とプランテーション公社 No. V で得た菌株 PTP-V の性状比較

菌種	基質	肉質組織の色	担子胞子			柄の有無
			大きさ(μm)	形状	表面構造	
G. lucidum	広葉樹類、ヤシ	黄褐色～褐色	10.0～12.0 × 6.5～8.0	倒卵形	イボ状	有柄
G. tsuga	モミ、シラビソ、マツ、ツガ	白色～黄褐色	11.0～15.2 × 6.5～8.5	倒卵形	イボ状	有柄
G. oregonense	針葉樹類	白色～黄褐色	13.0～15.5 × 7.5～9.0	倒卵形	イボ状	有柄
G. meredithae	マツ	黄褐色	9.5～11.5 × 5.5～6.5	倒卵形	イボ状	有柄
G. zonatum	朽ち木	暗褐色	11.0～13.0 × 5.5～6.5	細長い楕円形	イボ状、やや不明確	無柄
G. colossum	広葉樹類	黄褐色～灰褐色	14.5～15.5 × 9.5～11.5	倒卵形	イボ状	無柄
G. boninence	アブラヤシ	黄褐色～褐色	11.0～12.5 × 5.0～6.0	細長い楕円形	イボ状、やや不明確	無柄
PTP-V	アブラヤシ	黄褐色～褐色	11.0～12.0 × 5.3～6.0	細長い楕円形	イボ状、やや不明確	無柄～短い柄

[再委託研究]

1. Establishment of Transformation System in Oil palm

(Agency for the Assessment and Application of Technology)

Introduction

Transformation, in principle, refers to the stable introduction of genetic material into cells and its subsequent expression. Successful transformation for meeting plant improvement objectives requires the identification and isolation of the desired gene, its transfer to the targeted recipient, its stable integration into the genome of the recipient, and its development and tissue-specific expression. Some success has been achieved in plant genetic transformation and the crop transformation has developed rapidly. However, there are very few genetic
transformation studies reported in oil palm, so the transformation system of oil palm should be established as soon.

Oil palm is a typical monocot plant, and particle bombardment technology is one of the applicable methods for oil palm. In the recent years, a monocot plant (rice) has been successfully transformed by *Agrobacterium* based vectors, and to establish this method in oil palm, some important factors such as improved vector systems base on Ti and Ri plasmids of *Agrobacterium* and series of selectable markers genes should be done to get the best technology.

To improve the vector system, the vector containing intron region should be constructed to enhance gene expression particularly in monocotyledonous plant. There are some chemicals that are essential element for screening of transformed cells. The list of selectable marker and reporter genes employed successfully in plant genetic transformation now include hygromycin phosphotransferase (*hpt*), glucuronidase (GUS), neomycin phosphotransferase (*npt* I & II), the bar gene conferring phosphonitrocin resistance, the TN7 spt gene encoding streptomycin resistance and chloramphenicol acetyltransferase gene (cat).

Materials and Method

1) Introduction of reporter gene to oil palm by particle bombardment

- Construction of "reporter" gene vector; "Reporter" gene vector was constructed with promoter region from cauliflower Mosaic virus 35S gene and with coding region of bacterial β-glucuronidase (GUS).
- Preparation of embryogenic callus from immature embryo; Medium composition as explained on the Table 1.

- Shooting by particle "Gun" used electrostatic discharge; A suitable condition for shooting as explained on the Table 2. The shooting permits a direct delivery of DNA into intact cells or tissue. Very small gold particles (approx. 1 μm) coated with DNA are hitting and rushing into cells.
- Expression of reporter gene; Turning to blue.

2) *Agrobacterium*-mediated transformation.

- Isolation of plasmid DNA from *Agrobacterium*.
- Construction of *Agrobacterium* plasmid containing plasmid DNA and selectable marker gene (hygromycin), GUS reporter, Intron region from castor bean catalase gene, Mesocarp specific promoter and fragment DNA of desired gene.
- Preparation of embryogenic callus from immature Embryo; Media composition as explained on the Table 1.
- Transformation by *Agrobacterium*; This bacteria can transfer a portion of its DNA into plant cells and these fragments then integrate into chromosomes. For the bacterium to be an effective vehicle for DNA transfer, its disease-causing gene had to be removed. This alteration is known as disarming which means the elimination of tumor-inducing gene leaving the mechanism of DNA transfer intact.
- Selection of transformed plant cells on the media containing hygromycin. Genetically engineered plant cells with hygromycin resistance gene are able to grow on the media containing hygromycin.

Results

The medium compositions as shown in Table 1 have been applied for embryogenic callus induction medium from immature embryo. The callus induction has reached 90 to 100%.

To observe gene introduction and expression in oil palm tissue, transient expression of GUS (β-glucuronidase) reporter genes was monitored. The method was applied to fresh and cultured oil palm leaf and callus induced from younger leaf.

A transient GUS activity was monitored 48 hours after the transformation to study the histochemical expression of the reporter gene in oil palm. Blue spots in the tissues indicated that the GUS reporter gene could be expressed in oil palm.

In this experiment, we also used the vector containing intron region from castor bean catalase gene to enhance gene expression particularly in monocotyledonous plant. The intron region of catalase had a dramatic effect on the

enhancement gene expression in all plant species, though it was reported that catalase intron has an enhancement effect of gene expression only in monocot plant. Furthermore, the expression level of the GUS gene driven by 35S promoter in oil palm tissue was higher than those in rice and cucumber according to close observation in many experiments (Fig. 1).

We have isolated plasmid DNA from *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium* plasmids have been constructed from plasmid DNA, β-glucuronidase reporter gene (GUS), hygromycin resistance gene and an intron region from castor bean catalase gene to enhance gene expressions.

R & D for the next years

A suitable conditions for transformation by Agrobacterium will be studied with selectable marker hygromycin resistance, followed by selection the best condition for transformation without decreasing the regeneration ability and also to establish the method for the detection of DNA integration in transgenic oil palm by PCR method.

References

1. Gatehouse *et al*, 1992: Plant genetic manipulation for crop protection, Biotechnology in agriculture No.7, Redwood Press Ltd., Melksham.
2. Hartley, C.W.S ,1988: The Oil Palm, Tropical Agriculture Series, Third Edition, John Wiley & Sons,inc., New York.

Table 1 Effect of 2,4-D on callus induction from oilpalm immature leaf

Concentration of 2,4-D (ppm)	Number of cultured explants	Number of callus induced explants	Frequency of callus induction (%)
5	195	2	1.03
10	478	9	1.88
15	538	20	3.72
20	418	29	6.94
30	462	5	1.08

2. Optimizing Conditions for Callus Induction from Oil Palm Younger Leaf (Bakrie and Brothers)

Introduction

Progress in plant biochemistry and physiology research in the past twenty years has opened a good opportunity for improvement of plant behavior by two technologies. The first technology is a tissue culture and the second one is a genetic engineering. Tissue culture is a method which is aimed to regenerate a particular part of plants (e. g cells or tissues of particular organ) into a complete plant in vitro, whilst genetic engineering is a technique for manipulation of a particular character at molecular level. Combination of these two methods has proved to be powerful in improving plant characteristics, such as yield, adaptability, nutritive value, and disease or pest resistance.

Success of tissue culture of oil palm is mainly related to a number of factors, such as the choice of explant and medium composition. However, publications of oil palm tissue culture methods are not easily found due to the highly commercial aspect of this technique (Wooi, 1990). Therefore, it is necessary to establish our own laborartory and capability based on our own resources (genotype of oil palm, facilities). Basal medium for tissue culture is generally modified from MS medium with different combinations of plant growth hormones. There was reports describing that 2,4-D is the most suitable auxin for callus induction. However, the reported ranges of concentrations of this auxin were very wide, i. e. 1 ppm to 200 ppm. In our preliminary experiments, we were able to induce the oil palm callus formation using 2,4-D at concentration of 5-100 ppm in combination with various concentrations of an activated charcoal.

In this report, we optimize the 2,4-D level in oil palm callus induction media with fixed concentration of an activated charcoal.

Material and Method

1) Preparation of explant

The crown of oil palm tree (14 years old) was sampled from field by removing the outermost leaves. In a laminar flow, subsequently, the outer leaf whorls were removed and only the central portion above meristem region was used. These immature leaves were cut into small pieces (1cm) as an explant.

2) Preparation of culture medium

In organic and organic compositions of medium were based MS (Murashige et al. 1962) supplemented with 2,4-D, 2 iP, an activated charcoal, casein

hydrolyzate and tyrosine. The 2,4-D concentrations tested were 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, and 30 ppm. pH of culture medium was adjusted to 5.5 before autoclaving. The medium was solidified with 2.2g/1 of gerlite and distributed into test tubes.

3) Culture condition

Explants were embedded on media at horizontal position. The temperature of incubation was 27±1℃. In order to reduce oxidation of phenolic compounds, incubation was conducted in the dark until callus induction was observed and harvested. Experiment was done in three replicates.

Result and discussion

After one month, the culture turned to be brown and 34% of explants were seen to be dead, and this percentage increased to 90% after four months. Callus initiation on survived explants was observed at the edge of younger leaf after two months of incubation. Almost all of callus had a pale yellow color and globular or torpedo shape. In a few cases, rooting was also observed in addition to callus induction. Callus induction rate (CIR) was calculated as:

$$\frac{\text{Number of callus induced explants}}{\text{Total number of explant-Number of contaminated explants}} \times 100\%$$

All the five levels of 2,4-D tested were able to induce callus initiation. Table 1 shows the CIR from this experiment. Average CIR increased from 0.96% to 7.84% with then decreased to 1.36% at 30 ppm.

Ease of callusing is generally dependent on number of factors e. g. genotype of the oil palm tree, the distance from the target tissue to the meristem and also the type and concentration of auxin used in culture media (Rabechault et al., 1972). In fact, 2,4-D is the most widely used auxin for callus induction. The range of 2,4-D concentration from 15 ppm to 20 ppm were suitable for callus induction from oil palm immature leaf in our experiment. The highest CIR was 20.8% at 20 ppm of 2,4-D in our experiment. This rate is higher than any published report. Over 100 ppm of 2,4-D was used to get callus in some report (de Toucher et al. 1991). In the case of using higher concentration of 2,4-D, higher concentration of an activated charcoal was also used. When we used lower concentration of 2,4-D below 10 ppm, explants turned brown or dead quickly and only a small number of callus was induced.

Conclusions

This report describes procedures for callus induction of oil palm tissue (younger leaf). Callus was obtained after two months of culture on solid modified MS medium with different 2,4-D concentration. In the presence of 2,4-D at 15 ppm and 20 ppm, the CIR was 5.19% and 7.84% after four months culture period.

References

de Toucher, B., Duval, Y., Pannetier, C., (1991) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Plant Cell Reports, 10, 529-532,

Murashige, T., Skoog, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.

Rabechault, Martin, Cass, J.P. (1972) Recherches sur la culture des tissus de palmier a huile (*Elaeis quineensis* Jacg.). Oleogineux 27: 531-534.

Choo, W.K. (1990) Oil Palm (*Elaeis quineensis* Jacg.) Tissue Culture and Micropropagation. Biotechnology in Agriculture and forestry. vol. 10. Page: 569-592. Legumes and Oilseed Crops. Ed by Bajaj, Y.P.S.

Table 1 Medium composition for embryogenic callus induction from immature embryo of oil palm

Component		Concentration
Macro and micro salts	Murashige & Skoog	normal strength
Vitamins	Ganborg's B5	normal strength
Growth regulator	2,4-D	3 ppm
Sugars	sucrose	3.0%
	mannitol	0.5%
Browning inhibitor	casein hydorolysate	0.05%
	activated charcoal	0.1%
Others	tyrosine	0.5ppm
	coconuts water	15%
Solidify	gerlite	0.22%
pH		5.5

Table 2 A suitable condition for gene introduction to oil palm tissue by particle gun

Helium gas pressure	3 - 5 kgf/cm2
Shooting length	0.05 - 0.1 sec
Vacuum strength	600 mmHg
Distance from nozzle to sample	4 - 10 cm
Volume of DNA solution	5 ul

第4章　総合調査研究

①研究支援

集中研究の実施場所である生命工学工業技術研究所における研究の進捗を管理・促進するために「所内研究進捗検討会」を毎月1回開催し、各研究テーマの進捗状況について発表・討議を行った。また、「研究推進委員会」を隔月開催し、研究推進に必要な施策について協議・検討を実施した。

［所内研究進捗検討会開催状況］

平成9年度複合生物系プロジェクト
第1回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成9年9月22日（月）　午後2時30分～4時30分
場所：生命研第2研究本館会議室（2F）
出席者：倉根隆一郎 PL
　　生命研：進士秀明、山岡正和、栗山　博、中原東郎、金川貴博
　　相模原分室：沼尾長徳、渡部和郎、山田章子、鎌田正純、湯　玲子、石川千夏子
　　藤沢分室：渡辺吉雄、渡邊恒夫、廣末慎嗣、北出　理
　　横浜分室：田中　章
　　町田分室：砂村倫成
　　板橋分室：永井浩二
　　JBA：後藤暎二、高山義博

生命研の研究テーマ紹介
1）分子遺伝・組織化学的手法による複合微生物系解析技術（担当：丸山サブリーダー、海外出張のため倉根PLが紹介）
2）機能解析手法による複合微生物系解析技術と複合微生物系新規分離・培養技術（担当：山岡サブリーダー）
3）微生物コンソーシア解析技術と微生物コンソーシア培養制御技術（担当：金川サブリーダー）
4）植物・微生物系の認識応答解析利用技術（担当：進士サブリーダー）

平成9年度複合生物系プロジェクト
第2回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成9年10月27日（月）15：00～17：00
場所：生命研第2研究本館会議室（2F）
出席者：倉根隆一郎 PL

生命研：山岡正和、金川貴博、細矢博行、河原崎守、鎌形洋一、栗山博、
八木久彰、進士秀明、河野泰広、川原崎守、横地俊弘、深津武馬
相模原分室：矢澤一良、渡部和郎、山田章子、照屋潤二郎、湯　玲子、鎌田正純
石川千夏子
藤沢分室：北出　理
町田分室：河崎行繁、砂村倫成
味の素：鹿島信一
木更津分室：横幕豊一、蔵田信也、山田一隆
JBA：村山仁美

検討テーマ

1. 分子遺伝・組織化学的手法による複合微生物解析技術（生命研：細矢博行）
2. アブラヤシ、Ganoderma sp.、及び寄生／共存微生物間の相互作用の検討
（生命研：山岡正和）
3. 微生物コンソーシアにおける遺伝子交換を人為的に行わせる技術
DHA 産生細菌の単離　（相模原分室：山田章子）
4. 環境調和型油水分離ポリマー生産微生物コンソーシアの利用技術
（木更津分室：蔵田信也）

平成９年度複合生物系プロジェクト
第３回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成９年11月26日（水）　午後15時00分～18時00分
場所：生命研第２研究本館会議室（２Ｆ）
出席者：倉根隆一郎 PL
生命研：山岡正和、中原東郎、金川貴博、細矢博行、河原崎守、鎌形洋一、
丸山明彦、東原孝規、平井浩文、八木久彰
相模原分室：矢澤一良、渡部和郎、山田章子、照屋潤二郎、湯　玲子、
石川千夏子
藤沢分室：渡辺吉雄、廣末慎嗣、北出　理
町田分室：辻　堯、砂村倫成
味の素：鹿島信一
木更津分室：横幕豊一、蔵田信也、山田一隆
JBA：高山義博

検討テーマ

1. 分子遺伝・組織化学的手法による複合微生物解析技術（生命研：丸山明彦）
2. 機能解析手法による複合微生物系解析技術と複合微生物系新規分離培養技術

（生命研：東原孝規）

3. 微生物コンソーシアにおける遺伝子交換を人為的に行わせる技術
   DHA 産生細菌の単離　（相模原分室：照屋潤二郎）
4. 環境調和型油水分離ポリマー生産微生物コンソーシアの利用技術
   （木更津分室：山田一隆）

平成９年度複合生物系プロジェクト
第４回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成９年12月15日（月）　午後15時00分～17時00分
場所：生命研第２研究本館会議室（２Ｆ）
出席者：倉根隆一郎 PL
生命研：中原東郎、金川貴博、細矢博行、河野康広、横地俊弘、栗山　博、丸山明彦、東原孝規、八木久彰、深津武馬
相模原分室：渡部和郎、山田章子、鎌田正純、照屋潤二郎、湯　玲子、石川千夏子、鴻巣一恵
藤沢分室：渡辺吉雄、渡邊恒雄、廣末慎嗣
町田分室：辻　堯、吉村義隆、砂村倫成
味の素：鹿島信一
板橋分室：永井浩二
木更津分室：横幕豊一、蔵田信也、山田一隆
JBA：高山義博

検討テーマ
1. 機能解析手法による複合微生物系解析技術と複合微生物系新規分離培養技術(1)
   （生命研：中原東郎）
2. 機能解析手法による複合微生物系解析技術と複合微生物系新規分離培養技術(2)
   マングローブ生態系を中心とした微生物の機能的役割と相互作用の検討
   （生命研：横地俊弘）
3. 微生物コンソーシアにおける遺伝子交換を人為的に行わせる技術
   （相模原分室：鎌田正純）
4. 画像解析手法を用いた微生物の検出
   （町田分室：砂村倫成）

平成９年度複合生物系プロジェクト
第５回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成10年１月16日（金）　午後15時00分～17時30分
場所：生命研第２研究本館会議室（２Ｆ）
出席者：倉根隆一郎 PL
生命研：山岡正和、金川貴博、細矢博行、鎌形洋一、河野康広、
丸山明彦、東原孝規、八木久彰、深津武馬、平井浩文（NEDO フェロー）
相模原分室：山田章子、鎌田正純、照屋潤二郎、鴻巣一恵
藤沢分室：渡辺吉雄、渡邊恒雄、廣末慎嗣、北出　理
町田分室：河崎行繁、砂村倫成
板橋分室：鈴木賢一、永井浩二
木更津分室：横幕豊一、蔵田信也、山田一隆
JBA：高山義博

検討テーマ
1. 機能解析手法による複合微生物解析技術と複合微生物系新規分離培養技術
（生命研：河野泰広）
2. 水中のウイルスの解析
（生命研）八木久彰）
3. ヒラタケ、エノキタケなど担子菌類の子実体形成におよぼす複合微生物の影響
（藤沢分室：渡邊恒雄）
4. 特定複合微生物の検出、分離、選定、機能解析技術
（板橋分室：永井浩二）

平成９年度複合生物系プロジェクト
第６回所内研究進捗検討会議事録

日時：平成10年３月６日（金）　午後15時15分～17時30分
場所：生命研第２研究本館会議室（２Ｆ）
出席者：倉根隆一郎 PL
生命研：横地俊弘、中原東郎、川原崎　守、河野康広、丸山明彦、東原孝規、
八木久彰、深津武馬
NEDO フェロー：平井浩文、中川明子
相模原分室：矢澤一良、山田章子、鎌田正純、照屋潤二郎、石川千夏子
藤沢分室：渡辺吉雄、渡邊恒雄、廣末慎嗣、北出　理、（新里尚也）
町田分室：吉村義隆、砂村倫成
板橋分室：永井浩二

木更津分室：横幕豊一、蔵田信也、山田一隆
川崎分室：鹿島信一
JBA：高山義博

検討テーマ

1. 生物学的リン除去システムを構成する微生物個体群の解析
（生命研：川原崎　守）
2. 分子遺伝・組織化学的手法による複合微生物解析技術
（生命研：深津武馬）
3. シロアリ等の食材性昆虫の消化管内微生物複合系の解析
（藤沢分室：北出　理）
4. 木質分解複合微生物系の構築と木材腐朽菌の飼育
（藤沢分室：廣末慎嗣）

［研究推進委員会］

委員

倉根　隆一郎	生命工学工業技術研究所	委員長・プロジェクトリーダー
川本　勲	㈱海洋バイオテクノロジー研究所	サブプロジェクトリーダー
西田　浩史	メルシャン㈱	サブプロジェクトリーダー
溝田　健志	通産省基礎産業局生物化学産業課	
大西　啓仁	工業技術院総務課産業科学技術研究室	
新間　陽一	工業技術院総務課産業科学技術研究室	
橋詰　通夫	新エネルギー・産業技術総合開発機構応用技術開発室	
山下　勝	新エネルギー・産業技術総合開発機構応用技術開発室	
穴沢　慶確	新エネルギー・産業技術総合開発機構応用技術開発室	
古川　逸郎	新エネルギー・産業技術総合開発機構応用技術開発室	
丸山　明彦	生命工学工業技術研究所	
山岡　正和	生命工学工業技術研究所	
金川　貴博	生命工学工業技術研究所	
進士　秀明	生命工学工業技術研究所	
深津　武馬	生命工学工業技術研究所	
杉　正人	㈱海洋バイオテクノロジー研究所	
原山　重明	㈱海洋バイオテクノロジー研究所（釜石）	
志津里芳一	㈱海洋バイオテクノロジー研究所（清水）	
山田　和彦	JBA 川崎分室	
鹿島　信一	JBA 川崎分室	

横幕　豊一　　JBA 木更津分室
矢沢　一良　　JBA 相模原分室
沼尾　長徳　　JBA 相模原分室
田中　章　　JBA 横浜分室
大岸　治行　　JBA 横浜分室
辻　　堯　　JBA 町田分室
渡辺　東　　JBA 藤沢分室
渡辺　吉雄　　JBA 藤沢分室
鈴木　賢一　　JBA 板橋分室
地崎　修　　JBA
木幡　守　　JBA

事務局
後藤　暎二
高山　義博
村山　仁美

開催状況

成９年度複合生物系プロジェクト
第１回研究推進委員会議事録

日　時：平成９年度９月26日（金）10：00〜13：00
場　所：JBA 第一会議室
出席者：倉根隆一郎 PL
MITI 生物課；溝田　健志
工技院産技課；大西　啓仁
生命研；丸山明彦、山岡正和、金川貴博
NEDO；橋詰　通夫、古川　逸郎
町田分室；辻　堯、砂村　倫成
板橋分室；鈴木　賢一
川崎分室；鹿島　信一
木更津分室；横幕　豊一
相模原分室；沼尾　長徳、渡辺　和郎、山田　章子
藤沢分室；渡辺　東、渡辺　吉雄
横浜分室；大岸　治行、田中　章
MBI；川本　勲、持田　顕一
JBA；石川　不二夫、地崎　修、木幡　守、後藤　暎二、松永　研一郎、
高山　義博

議　題：

1. SPL（サブプロジェクトリーダー）の選任
2. 研究体運営規定の内容
3. 事務局の一本化
4. 研究進捗状況検討会の進め方
5. 分室（従たる研究室）の研究管理方法
6. プロジェクト原簿の作成（目標の数値化）
7. その他

1）海外との共同研究
2）再委託期間
3）研究成果の発表に PL、 SPL 名の付記をする件
4）海外の生物資源確保

平成９年度複合生物系プロジェクト
第２回　研究推進委員会議事録

日　時：平成９年11月28日（金）　15：00〜19：00
場　所：JBA 第一会議室
出席者：倉根隆一郎 PJ、西田浩史 SPL、川本　勲 SPL
MITI 生物課：溝田健志
工技院産技課：新間陽一
生命研：丸山明彦、山岡正和、金川貴博、進士秀明
NEDO：橋詰通夫、古川逸郎、穴沢慶確
MBI 本社：杉　正人
MBI 釜石：山本　敏
MBI 清水：持田顕一、陳　兆隆
町田分室：河崎行繁
板橋分室：鈴木賢一
川崎分室：鹿島信一
木更津分室：横幕豊一
相模原分室：矢澤一良、沼尾長徳、渡辺和郎、山田章子
藤沢分室：渡辺　東、渡辺吉雄
横浜分室：大岸治行、田中　章、村瀬　誠
JBA：地崎　修、木幡　守、後藤暎二、高山義博
村山仁美、長島由果

議題
(1)報告及び協議事項

a）第1回研究推進委員会議事録確認
b）PLとJBA分室、MBI（釜石、清水）との打ち合わせ
（打ち合わせ順番と報告書の作成について）
c）研究推進委員会発表順
d）プロジェクト原簿評価軸の考え方
e）原簿作成WORK状況
f）出張報告書の記載要領
g）出張先の特例（新設）
h）資源アクセスの件
i）海外よりの参加提案（英国、ブル教授）
j）学会発表に関する注意（運営体規程）
k）平成10年度農芸化学会シンポジウム「複合生物系」への参加のお願い
l）その他（次回等）

(2)研究成果発表
発表課題
a）植物・微生物の認識・応答プログラムの解読と利用
生命工学工業技術研究所　進士秀明
b）環境調和型油水分離ポリマー生産微生物コンソーシアの利用技術
環境エンジニアリング㈱　　横幕豊一
c）多様性解析のためのgyrB遺伝子等を用いた数値解析手法
㈱海洋バイオテクノロジー研究所（釜石）　山本　敏
d）生分解性ポリマーを生産する海洋性細菌についての検討
㈱海洋バイオテクノロジー研究所（清水）　陳　兆隆

平成9年度複合生物系プロジェクト
第3回　研究推進委員会議事録

日　時：平成10年1月14日（水）　15：00〜18：45
場　所：ホリデーイン（雅）
出席者：倉根隆一郎PL、西田浩史SPL、川本　勲SPL
工技院産技課：　大西啓仁
生命研：丸山明彦、山岡正和、金川貴博、深津武馬
NEDO：橋詰通夫、穴沢慶確
MBI本社：杉　正人
MBI釜石：原山重明、牧　秀明
MBI清水：志津里芳一、谷本祐一
町田分室：辻　堯

板橋分室：永井浩二
川崎分室：鹿島信一
木更津分室：横幕豊一、山田一隆
相模原分室：矢澤一良、沼尾長徳、渡辺和郎、山田章子
藤沢分室：渡辺　東、渡辺吉雄
横浜分室：田中　章、佐野　浩
JBA：地崎　修、木幡　守、後藤暎二、高山義博
村山仁美、坂本理奈

議題

(1) 報告及び協議事項

①第2回研究推進委員会議事録確認
②研究推進委員会規定（案）
③研究推進委員会委員名簿（案）
④複合生物系プロジェクト海外調査
⑤「複合生物系等」の定義と解釈
⑥プロジェクト原簿の作成状況
⑦資源アクセス
⑧海外からの参加提案（アイルランド／フォーバイト）
⑨プロジェクト研究体発足式
⑩NEDO 産業技術研究員
⑪平成10年度外部研究発表会
⑫その他（次回等）

(2)研究成果発表

①複合生物系解析技術・微生物コンソーシア解析技術
（活性汚泥中での糸状の細菌の動態把握）　生命工学工業技術研究所　金川貴博
②微生物コンソーシアにおける遺伝子交換を人為的に行わせる技術
㈶相模中央化学研究所　矢澤一良
③光分解と微生物分解の組み合わせによる原油留分の効率的除去
㈱バイオテクノロジー研究所（釜石）　牧　秀明
④未利用資源利用技術（分離・培養技術）
（海洋生物等に寄生・共生する微生物等の分離培養とその利用）
㈱バイオテクノロジー研究所（清水）　谷本祐一

平成９年度複合生物系プロジェクト
第４回　研究推進委員会議事録

日　時：平成10年３月26日（木）　10：20〜11：45
場　所：虎ノ門パストラル　新館４Ｆ　桜の間
出席者：倉根隆一郎 PL、西田浩史 SPL、川本　勲 SPL
MITI 生物課：溝田健志
工技院生命研：丸山明彦、山岡正和、深津武馬
NEDO：穴沢慶確、古川逸郎
MBI 本社：杉　正人
MBI 清水：　志津里芳一
町田分室：辻　堯、直原哲夫
板橋分室：鈴木賢一、永井浩二
川崎分室：鹿島信一
木更津分室：横幕豊一
相模原分室：矢澤一良、沼尾長徳、山田章子
藤沢分室：渡辺　東、渡辺吉雄
横浜分室：田中　章、佐野　浩
JBA　：後藤暎二、長島由果、高山義博

議題
［報告及び協議事項］
①第３回研究推進委員会議事録確認
②海外調査に関する報告
③平成10年度外部研究発表会
④プロジェクト原簿（３次案）について
⑤研究体運営規程について

②再委託研究

Lichens of Brazil: Cerrado (Savanna) Region

(Institute Butantan)

INTRODUCTION

Many microorganisms live much of their lives in a special ecological relationship: an important part of their environment is a member of another species.Any microorganism that spends a portion or all of its life associated with another organism of a different species is called a symbiont (or symbiote), and the relationship is designated as symbiosis.

Symbiosis

There are three types of symbiotic relationship: commensalism, mutualism, and parasitism. Within each category the association may be either ectosymbiotic or endosymbiotic. In ectosymbiosis one organism remains outside the other. In endosymbiosis one organism is present within the other.

Commensalism

Commensalism is a relationship in which one organism, the commensal, benefits while the other, the host, is neither harmed nor helped. Often both the host and the commensal "eat at the same table". The spatial proximity of the two partners permits the commensal to feed on substances captured or ingested by the host. Typically the commensal also obtains shelter by living either on or in the host. The commensal is not directly dependent on the host metabolically and causes it no particular harm. When the commensal is separated from its host experimentally, it can survive without being provided some factor or factors of host origin. For example, the common, nonpathogenic strain of Escherichia coli lives in the human colon and benefits from the nutrients, warmth, and shelter found there but usually causes no disease or discomfort.

Mutualism

Mutualism defines the relationship in which some reciprocal benefit accrues to both partners. In this relationship the mutualist and the host are metabolically dependent on each other. Several examples of mutualism are presented next.

The Protozoan-Termite Relationship

A classic example of mutualism is the flagellated protozoa that live in the gut of termites and wood roaches. These flagellates exist entirely on a diet of carbohydrates, acquired as cellulose wood chips ingested by their host.

The protozoa engulf wood particles, digest the cellulose, and metabolize it to acetate and other products. Termites oxidize the acetate released by their flagellates. Because the host is incapable of synthesizing cellulases (enzymes that catalyse the hydrolysis of cellulose), it is dependent on the mutualistic protozoa for its existence.

This mutualistic relationship can be readily tested in the laboratory if termites are placed in a bell jar containing wood and a high concentration of O_2. Because O_2 is toxic to the flagellates, they die. The termites are unaffected by the high O_2 concentration and continue to ingest wood, but they soon die of starvation due to a lack of cellulases.

Lichens

Another excellent example of mutualism is provided by lichens.Lichens are the association between ascomycetes (the fungus) and certain genera of either green algae or cyanobacteria. In a lichen the fungal partner is termed the mycobiont and the algal or cyanobacterial partner, the phycobiont. The remarkable respect of this mutualistic association is that its morphology and metabolic relationship are so constant that lichens are assigned generic and species names. The characteristic morphology of a given lichen is a property of the mutualistic association and is not exhibited by either symbiont individually. There are three morphological types of lichens: crustose lichens are compact and appressed to a substratum such as a rock; foliose lichens have a leaflike appearance; and fruticose lichens have a shrubby shape.

Because the phycobiont functions as a photosynthetic organism - dependent only on light, air, and certain minerals nutrients - the fungus can get its organic carbon directly from the alga or organobacterium. The fungus often obtains nutrients from its partner by haustoria (projections of fungal hyphae) that penetrate the phycobiont cell wall. It also uses the O_2 produced during phycobiont photosynthesis in carrying out respiration. In turn the fungus protects the phycobiont from excess light intensities, supplies water and minerals to it, and provides a firm substratum within which the phycobiont can grow protected from environmental stress.

Parasitism

The parasitic way of life is so successful that it has evolved independently in nearly all groups of microorganisms. In recent years concerted efforts to understand microorganisms and their relationships with their hosts have developed within the disciplines of virology, rickettsiology, chlamydiology, bacteriology, mycology, parasitology (protozoology and helminthology), entomology, and zoology.

If a symbiont either harms or lives at the expense of another organism (the host), it is a parasitic organism, and the body of the host can be viewed as a microenvironment that shelters and supports the growth and multiplication of the parasitic organism. The parasitic organism is usually the smaller of the two partners and is metabolically dependent on the host. There are many parasitic agents or organisms among the viruses, procaryotes, fungi, plants, and animals. By convention, when the word parasite is used without qualification, it refers specifically to a protozoan or helminthic (nematode, trematode, cestode) organism.

Several types of parasitism are recognized. If an organism lives on the surface of its host, it is an ectoparasite; if it lives internally, it is an endoparasite. The host on or in which the parasitic organism either attains sexual maturity or reproduces is the final host. A host that serves as a temporary but essential environment for development is an intermediate host. In contrast, a transfer host is not necessary for the completion of the organism's life cycle but is used as a vehicle for reaching a final host. A host infected with a parasitic organism that also can infect humans is called a reservoir host.

Because, by definition, parasitic organisms are dependent on their hosts, the symbiotic relationship between the host and parasite is a dynamic one. When a parasite is growing and multiplying within or on a host, the host is said to have an infection. The nature of an infection can vary widely with respect to severity, location, and number of organisms involved. An infection may or may not result in overt disease. An infectious disease is any change from a state of health in which part or all of the host body is not properly adjusted or capable of carrying on its normal functions due to the presence of a parasitic organism or its products. Any parasitic organism or agent that produces such a disease is a pathogen. Its ability to cause disease is called pathogenicity.

LICHENS

The unusual structure of the lichens was not discovered until after the development of the microscope. The name of this group of plants first appears in the writings of Theophrastus, a disciple of Aristotle, about the 4th century B.C. At that time, and for many centuries thereafter, lichens were confused with the mosses and the hepatics. The early students of lichens thought that the green cells (now known to be alga) were specialized structures produced by the fungus and probably of reproductive function. Wallroth (1825) coined the term gonidia to indicate this reproductive function, but also mentioned the resemblance to some of the well-known free-living algae. It was not until 1867 that Simon Schwendener announced that the green cells were indeed algae, and that the fungi were parasitic upon them. After the introduction of pure culture techniques, the constituents of numerous lichens were isolated and grown apart from each other and then recombined. The resulting lichen, however, appears somewhat diferent from the original, and the experimental demonstration of the complete life cycle presents difficulties.

Because the lichen appears as a healthy organism which thrives in very severe environments, the interpretation of the relationship as a simple case of parasitism did not satisfy many of the workers in this field. The term consortium (a union or fellowship) was proposed by Johannes Reinke (1873) to explain the relationship; then H.A. de Bary (1873) suggested that symbiosis would be a more satisfactory term to describe the relationship. Experimentation shows that there is not only manufacture of the food by the alga in the process of photosynthesis and absorption of water from the atmosphere by the fungus, but that there is also an exchange of complex organic compounds between the components of the lichen.

The constancy of the algal host in the lichen relationship is undetermined. Although the same genus of alga is present in a given species of lichen, there are indications that different species or races of the alga may be present. In some lichens there may be two groups of algae represented in the thallus. In *Peltigera aphthosa* and *P. venosa*, for example, the alga in the thallus is one of the green algae, *Coccomyxa*, while the blue-green alga, *Nostoc*, is found in special gall-like growths called cephalodia. In *Solorina crocea* there may be two layers of the two types of algae. The algae of lichen are often considerably different from free-living algae of the same genus, and only by pure culture can they be definitely identified. Some of the algae may change their color. Others which normally grow in chains of cells may be broken up into cell units scattered throughout the thallus.

Lichens are found throughout the world, often occupying niches in which no other plants can become established. They are most conspicuous in the alpine and arctic tundras, where they are dominant forms of vegetation. The rock outcrops of the world are usually clothed wich an abundance of these plants. Lichens are almost the only plants able to survive the severe conditions of life found at high altitudes and latitudes.

In Antarctica, where there are very few flowering plants and perhaps 60 mosses, there are more than 400 species of lichens. In more temperate regions the lichens are common in undisturbed habitats in old fields, in bogs and in florests, on the soil and old rotting logs, on tree trunks and branches. In tropical regions lichens are abundant, with different species occupying the ecological niches occupied by other species in other parts of the world. Few species survive in the vicinity of large cities, where they are killed by smoke and gases. The higher temperatures and consequent drier conditions of cities may also reduce lichen populations.

Lichens are bioindicators of air quality because they are extremely sensitive to two common atmospherie pollutants - ozone (O_3) and sulfur dioxide (SO_2). This sensitivity arises from the lichens's great ability to absorb and concentrate substances dissolved in rain and dew. Because they have no means of excreting absorbed elements, lichens are particularly sensitive to toxic compounds. Lichen distribution thus is inversely related to the amount of SO_2, O_3, and toxic metals in the atmosphere. These pollutants are easily absorbed by lichens and destroy both chlorophylls a and b.

This decreases photosynthesis and disrupts the metabolic balance between the fungus and the alga or cyanobacterium. Eventually this leads to the destruction of the lichen.

Lichen vary in their response to pollutants. The best bioindicators are the moderately sensitive species, such as *Hypogymnia enteromorpha*. This species also can be used as a means to assess pollution by radioactive substances that may occur following the crash of satellites, uranium mining operations, and nuclear fallout from weapon testing.

USES AND VALUES

Soil Formation - Lichens are well known as pioneers on bare rock surfaces. Here some of them act by secreting acids which dissolve the material that cements the particles together. On limestone some species of *Verrucaria* and *Caloplaca* may dissolve pits in the rock surface. Other lichens help to fragment the rock by expanding when wet, attaching to the rock, them contracting when dry, thereby plucking away particles of the rock. Still others may act by a process of chemical binding to remove some of the mineral elements from the crystals of the rock. As the rock becomes broken up by action of the lichens and by weathering, the debris furnishes a lodging for the growth of mosses and eventually higher plants.

Erosion Control - Some species of lichen thrive on very sandy soil. Here the undifferentiated plant body or thallus of a species such as *Lecidea uliginosa* will help materially in binding the soil surface against the action of the wind. On clay soils in abandoned roadbeds in the eastern United States, *Baeomyces roseus* helps to protect against water erosion by binding the soil surface.

Food - In the arctic and subarctic regions lichens are important as forage for reindeer, caribou, musk ox and moose. Lichens of the so-called reindeer moss group (*Cladonia mitis, C. sylvatica, C. alpestris*) and Iceland moss (*Cetraria islandica*) are the most important species. Because growth in these northern climates is so slow, 35 to 38 years are required for an area to recover from grazing. The area required to support a herd thus is enormous, and the Laplanders whose reindeer herds subsist mainly on lichens are forced to be nomadic people. Iceland moss is used in Greenland and Iceland as a supplement in the food of sheep and cattle as well as of human beings. For use as food, the lichen is soaked in soda solution to neutralize the lichen acids, dried and powdered, and then mixed with potatoes. Some of the rock tripes (leafy or foliose forms) *Umbilicaria* species, have been used as emergency foods by explorers, but the action of the lichen substances on the body is generaly unpleasant. One of plants credited with being the manna of the children of Israel is the lichen *Lecanora esculenta* of north Africa and Asia Minor. This species sometimes rolls before the desert winds in great quantities. Numerous small animals feed to a limited extent on lichen thalli; slugs, snails, mites, caterpillars and termites all are reported to feed upon lichens.

Medicine - The fancied resemblance of lichens to parts of man's body led in earlier times to their use in the treatment of various ailments. For example, the lungwort, *Lobaria pulmonaria*, has the appearance of the surface of the lungs, hence was used to treat tuberculosis, pneumonia and similar afftictions; the yellow *Xanthoria parietina* was valuable in cases of jaundice; the dog lichen, *Peltigera canina*, with its fruits resembling teeth in a jaw, was used in treatment of rabies. The skull lichen, *Parmelia saxatilis*, was considered excellent for epilepsy if found on old skulls instead of its usual habitat on tree trunks and rocks; its value was greatly enhanced if the skull happened to be that of an executed criminal. These fanciful treatments-based on the "doctrine of signatures", by which nature was believed to have placed a sign indicating the value of the plant to man-have given way to more scientific remedies. Many of the lichens contain usnic acid and other lichen acids whith have been shown to have antibacterial properties. In Scandinavia the reindeer lichens have been used in the manufacture of alcohol, but difficulties in obtaining raw materials for this industry arise because the regrowth of the lichen supplies is so slow. The wolf lichen,

Letharia vulpina, has been used in Russia for poisoning wolves. One of lichens of the plaints of western North America, *Parmelia chlorochroa*, accumulates selenium and is therefore poisonous to livestock.

Perfumes - The oak moss lichen, *Evernia prunastri* and related species, is gathered in southern Europe and used in perfumes; it functions as a fixative to assist in controlling the uniform evaporation of the many varied ingredients of the perfumes.

Dyes - Probably the most familiar use of dyes derived from lichens is in the litmus paper (paper saturated with litmus solution) of the chemist. This reddish-violet dye, litmus used as an acid-base indicator, is prepared from a purple or reddish-purple dyestuff called orchil, archil or cudbear. In Europe, cudbear, *Ochrolechia tartarea*, a crustose lichen (having a thin flat crusty aspect), is scraped from the rocks and used in the preparation of the dyestuff. In the Canary Islands, Madagascar, the coast of South America and formerly along the coast of California, various species of orchil lichens, *Roccella tinctoria* and other of *Roccella*, are gathered, prepared with sodium or ammonium hydroxide solutions and used for dyeing for wool and silk. Rock tripes, *Umbilicaria* and *Parmelia* species and other lichens are used in northern countries as sources of other dyestuffs, giving soft browns, yellows and other colors to wool.

Evolution - There is no record in the rocks as to the antiquity of the lichens, but it is obvious that this symbiotic organism must be more recent than its components. It is also obvious that lichens are not primitive but highly developed structures. Both the symbionts are polyphyletic; that is, the algae come from several groups, and the fungi, likewise, are of several widely different origins. Presumably the earliest lichens were a loose association of fungal hyphae with free-living algae. Some lichens are still on this borderline. In *Calicium* and *Mycocalicium* it is sometimes difficult to be certain of the presence of the alga. Some fungi such as *Leotia* may contain algal cells in their fruiting bodies. Evolution probably developed from these loose associations to a definite crustose structure, then to the leafy (foliose) structure and finally to the intricate fruticose (shrubby or bushy) type of thallus.

PHYTOGEOGRAPHY AND ECOLOGY

Distribution - So much remains to be done in the collection and study of lichens that only the general outlines of the distribution patterns can be described. For those which have been studied, patterns matching those of the better-known flowering plants can be shown, but some unique patterns have been found. In the arctic there is a circumpolar distribution type containing many widespread species such as *Alectoria ochroleuca, Cetraria nivalis, C. cucullata and Parmelia centrifuga*. An Arcto-Pacific distribution type contains species which are found in Siberia and in the western American arctic; e.g., *Cetraria richardsonii* and *Cetraria chrysantha*. A lichen occurring in both arctic and antarctic regions is *Usnea* (Neuropogon) *sulphureus*. A very large number of lichens of the temperate zone occur around the world, so that manuals of European lichens are of great help in studying North American lichens and vice versa. Such genera as *Alectoria, Cladonia, Caloplaca, Lecidea, Lecanora, Parmelia, Physcia and Rinodina* provide many examples of such wide distribution. A few species such as *Lecidea olivacea, Alectoria fremontii, Cavernularia hultenii* and *Lobaria hallii* are found in the western parts of both North America and Europe. Some species such as *Cetraria oakesiana* and *Baeomyces roseus* are found in eastern North America and in Europe.

Mediterranean desert lichens such as *Physcia biziana* are also found in the arid regions of western North America. Along the coastal regions of western North America are a number of lichens which also occur Japan.

Tropical lichens tend to be represented strongly lichen fungi associated with the algal genus *Trentepohlia*. Although many of the same genera that occur in temperate regions are

present, the predominant lichens are different. The families Graphidaceae, Pyrenulaceae, Astrotheliaceae, Paratheliaceae, Coenogoniaceae, Thelotremaceae, Stictacaea and Parmeliaceae are conspicuous among the tropical groups.

In antarctic regions the most conspicuous lichens are the Stictaceae, the Cladoniae and members of the subgenus Neuropogon of the genus Usnea.In antarctica there are more than 400 lichens, the bulk of them being crustose; the genus Buellia is the best represented.

BIOCHEMISTRY AND SECONDARY METABOLITES

Intracellular and extracellular products

There are two main groups of lichen compounds: primary metabolites (intracellular) and secondary metabolites (extracellular). Common intracellular products occurring in lichens include proteins, amino acids, polyols, carotenoids, polysaccharides and vitamins, which are bound in the cell walls and the protoplasts, are often water soluble and can be extracted with boiling water. Some of these products are synthesized by the fungus and some by the alga. Since the lichen thallus is a composite structure, it is not always possible to decide, where a particular compound is biosynthesized. Most of the intracellular products isolated from lichens are nonspecific, and also occur in free-living fungi, algae and in higher green plants (Hale 1983).

The majority of organic compounds found in lichens are secondary metabolites of the fungal component, which are deposited on the surface of the hyphae rather than within the cells. These products are usually insoluble in water and can only be extracted with organic solvents. Carbon for the lichen is furnished primarily by the photosynthetic activity of the algal partner. Mosbach (1969) summarized the overall carbon metabolic sequence as involving photosynthesis in the photobiont followed by transport of the carbohydrate to the fungus, metabolism of the carbohydrate and subsequent biosynthesis of lichen secondary metabolites. The type of carbohydrate released by the alga and supplied to the fungus is determined by the photobiont, while in lichens containing cyanobacteria, the carbohydrate released and transferred to the fungus is glucose. In lichens containing green algae, the carbohydrate released and transferred to the fungus is a polyol: ribitol, erythritol, or sorbitol.

The fungal origin of the secondary metabolites

All of secondary substances which are so characteristic of lichens are of fungal origin. Consequently it seems rather surprising that with more than 630 secondary metabolites known from lichens, most are unique to these organisms and only a small minority (c. 50-60) occur in other fungi or higher plants. As an example, the anthraquinome parietin, the orange pigment common in most Teloschistales, occurs in species of the non-lichenized fungal genera *Achaetomium, Alternaria, Aspergillus, Dermocybe* and *Penicillium*, as well as in the vascular plants *Rheum*, *Rumex* and *Ventilago*. Similarly, the common para-depside lecanoric acid also occurs in the fungal genus Pyricularia, while the typical higther plant sterol,brassicasterol, has also been detected in the lichens.

TABLE 1

Major classes of secondary metabolites in lichens

1. Acetyl-polymalonyl pathway
Secondary aliphatic acids, esters and related derivatives (45 known compounds)
Polyketide derived aromatic compounds:
Mononuclear phenolic compounds (19)
Di- and tri-aryl derivatives of simple phenolic units:
Depsides, tridepsides and benzyl esters (185)
Depsidones and diphenyl ethers (112)
Depsones (16)
Dibenzofurans, usnic acids and derrivatives (23)
Anthraquinones and biogenetically related xanthones (56)
Chromones (13)
Naphthaquinomes (4)
Xanthones (44)

2. Mevalonic acid pathway
di-, sester- and triterpenes (70)
Steroids (41)

3. Shikmic acid pathway
Terphenylquinomes (2)
Pulvinic acid derivatives (12)

Secondary metabolites

Direct evidence from biosynthetic investigations on intact lichens using labeled compounds is meager, but hypothetical pathways are often proposed on the basis of what is known for the biosynthesis of analogous fungal products (Turner and Aldridge 1983). In addition, further circumstantial evidence may be forthcoming from observed joint occurrence of compounds and laboratory interconversions and biomimetic syntheses (Culberson and Elix 1989). In the past nearly all the chemical data came from studies of natural lichens because cultures of lichen fungi grow very slowly and failed to show all products characteristic of mature thalli in nature. However, recent advances in the controlled growth of recombined species promise to open new areas of research whereby the biosynthetic sequence to various lichen acids can possibly be confirmed. Most of the secondary metabolites present in lichens are derived from the acetylpolymalonyl pathway, but some come from the shikimic acid and mevalonic acid pathways. One of the more interesting developments in recent years is the recognition of the key role played by para-depsides as potential precursors (or biosynthetic intermediates) to meta-depsides, depsones, diphenyl ethers, depsidones and dibenzofurans (Culberson and Elix 1989). Very recent experimental evidence obtained with cultured lichens is consistent with these suggestions.

Major categories of lichen products

The first classification of lichen substances based on known structures and biosynthetic pathways was constructed by Asahina and Shibata (1954). This system is modified from time to time, as more information has become available, most recently by Culberson and Elix (1989). The

principal classes of lichen secondary metabolites are listed in Table according to their probable biosynthetic origin, with the approximate number of compounds of known structure indicated (in parentheses) and the structure of typical representative compounds (Fig 2).

Of the acetyl-polymalonyl derived compounds, aromatic products are especially well represented, the most characteristic being formed by the bonding of two or three orcinol or B-orcinol-type phenolic units through ester, ether and carbon-carbon linkages. The large majority of depsieds, depsidones, dibenzofurans, usnic acids and depsones all appear to be produced by such mechanisms and all are peculiar to lichens.

Other aromatic compounds of acetate-polymalonate origin such as the chromones, xanthones and anthraquinomes, are probably formed by internal cyclization of a single, folded polyketide chain and are often identical or analogous to products of non-lichen-forming fungi or higher plants.

Collecta:

Considering the short term research, one has decided to concentrate on one area of Brazil, specifically the savana area (cerrado) of southwest in the state of Mato Grosso, where a lichen collection has been intermittently going on, carried out by Gustav Malme (1902, 1924, 1925, 1928, 1934 e 1936) and Klaus Kalb (1987).More recently, Fleigand Riquelme (1992) have published a part of results obtained during the period of 1990-1991.Honda collected 365 samples; 315 of them were identified, 275 of them at the level of species, 50 at genus. Identified samples were classified into 28 families, 50 genus and 89 species. Foliose lichens were the most abundant, represented by genus *Parmotrema* and *Pseudoparmelia*. Few species were abundant enough to be collected for chemical analysis. Fruticose lichens constituted about 10 % of collected samples.

Experimental

Materials - All solvents of commercial grade were distilled in the laboratory. For HPLC analysis, only HPLC grade soluents were used and for punification, crystalization and TLC analysis P.A. grade solvents were used.

For the MP determinação mod. 498 of Uniscience was used without correction.

Zeiss microscope was used for the analysis of the crystalline structure.

For IR analysis, the instrument Perkin Elmer mod. 783 was used, ^{1}H - NMR analysis was carried out on 300 MHZ (Brucker) and ^{13}C - NMR on 75 MHZ (Brucker) at the University of São Paulo. Samples were dissolved in $CDCL_3$, DMSO-d_6, CD_3COCD_3, C_5D_5N and chemical shift expressed in δ (ppm) using TMS as the internal standart. Coupling constants are expressed in Hz.

Elemental analysis were also carried out at the University of São Paulo and mass spectrometric analysis also.

Optical rotation determination was done with Perkin - Elmer mod. 341 at wavelength 589 nm.

Methods - chromatography

Thin layer chromatografy (TLC) analysis was done using silica gel G (Merck and Sigma) or silica gel $HF_{254+366}$, $PF_{254+366}$ prepared on plates of 5 x 20 cm and 20 x 20 cm. For visualization UV light (254 and 366 mm) was used. Subsequently the plates were sprayed with p-anisaldehyde/sulfuric acid, methanol containing 10% concentrated sulfuric acid and then heated at 110°C in an oven or hotplate for 10 minutes to develop the spots. Sulfuric acid charring detects the broadest of compound types, including virtually all terpenes and phenolic derivatives. After the plates are charred, compounds give a range of characteristic visible colors and some even have a characteristic fluorescence.

Chromatographic columns were prepared with grained silica particles (63-200 μm). The solvent systems used:

A. Toluene: ethylacetate: glacial acetie acid (6:4:1 v/v)

B. Benzene: dioxane: acetic acid (90:25:4 v/v)

C. Toluene: chloroform (1:1 v/v)

D. Toluene: chloroform (3:2 v/v)

E. Choloroform: methanol (24:1 v/v)

Microcrystallization

Asahina's microcrystallization technique allowed definitive recognition of individua lichen acids on a routine bases. This simple technique required no special equipment, an with experience generally yielded accurate analyses of major products. It involved extraction of a lichen fragment with acetone, evaporation of the solvent and recrystallization of the remaining residue from a suitable solvent - all conducted on a microscope slide (Asahina and Shibata, 1954). A particular lichen substance crystallized in a distinctive shape and color and was identified by comparison with photographs of authentic materials (Hale 1974).

Mixtures of solvents used were:

1. glycerol: ethanol: o-toluidine (3:2:1 v/v)
2. glycerol: ethanol: water (1:1:1 v/v)
3. glycerol: glacial acetic acid (3:1 v/v), and when nacessary
4. glycerol, ethanol, aniline (2:2:1 v/v)
5. glycerol, ethanol, quinoline (2:2:1 v/v)
6. glycerol, ethanol, pyridine (1:3:1 v/v), and K_2CO_3 solution

(10%) and saturated solution of $BA(OH)_2$ according to Taylor (1967a,1967b), Thompson (1968) and Hale (1974).

It is obvious that this method of crystallization can't detect minor components and is inadequate for the study of mixtures and it has to be complemented with chromatographic methods. Even so, using Asahina's method, botanists discovered extensive correlations between chemistry, morphology and the geographic distributions of lichens.

Bioassay for Biological Activity

Fungicidal Activity

Bioautography tests were done on compounds purified by TLC (Merck) using solvent A using the spores of fungus *Cladosporium sphaerospermum* Penzig. Plates were sprayed with suspention of fungus spores suspended in saline solution with glucose and incubated for 48h in a dark humid chamber at 30° C (Homan's et al. 1970)

The fungicidal activity was evaluated by the size of the hallow formed due to the inhibition.

The fungus *Cladosporium sphaerospermum* was cultured in BDA medium at 28° C in the absence of light until sporulatin. The fungus culture was maintained in sterilized distilled water according to Figueiredo et al. (1975).

Cytotoxic Activity

The in vivo lethality in a simple organism can be used as a rapid and simple convenient monitor. The eggs of brine shrimp, Artemia salina, are readily available at low

cost and can remain viable in the dry state. Upon being placed in a brine solution, the eggs hatch within 4 hours, providing large numbers of larval. This is a simple inexpensive bench-top assay procedere; compared to the more tedious and expensive in vivo and in vitro assays.

The lethality data can then processed to estimate LC_{50} values. (Finney et al. 1971).

Chemical Analysis and Results

Parmotrema tinctorum (Nyl.) Hale

Sample (P.T.) was collected and after washing and tha removal of debris, it was pulverized resulting in 40g of powder. Organic extraction was exhaustively done in Soxhlet, using benzene and acetone.

Benzene extraction phase, produced 0.246g (0.615% of the original sample).

TCL analysis showed:

Solvent A: one component

Solvent C: two main components

HPLC analysis: more than one component

Due to the presence of pigments and aliphatic compounds, the sample was passed through chromatographic column of silica gel, using as eluent the solvent C. Total of 27 fractions of 12 ml each were collected. After the removal of the solvent, each fraction was with ethanol and supernatant removed. Residues were dissolved in chroform and purified on TCL. Spots with similar R_F were collected and rechromatographed. The separation of components by crystallization was attempted but not sucessful.

Preparative chromatography, using solvent D was carried out and fractions were eluted with chloroform and crystallized in chloroform/ethanol. One of the fractions (P.T.B1) produced white crystals of needle shape. This crystal had M.P. of 196-198°C. The fraction P.T.B2 showed to be a mixture of P.T.B1 and due to its small amount, spectral analysis was not carried out.

The sample P.T.B1 showed the following spectrum:

IV(KBr) $V_{máx}$ cm^{-1}: 3200-2950, 1660, 1580, 1440, 1405, 1380, 1355, 1285, 1270, 1195, 1165, 1105, 1070.

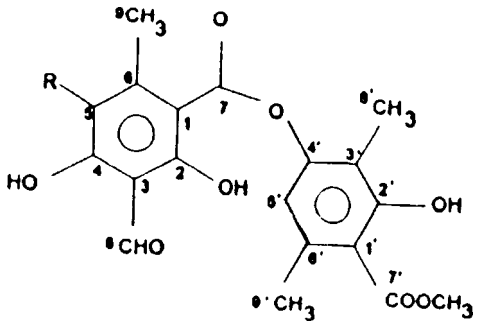
RMN1 H($CDCL_3$, 300 MHz) δ (ppm): 2.07 (3H, s, $ArCH_3$ C-8'), 2.52 (3H, s, $ArCH_3$ C-9'), 2.67 (3H, s, $ArCH_3$ C-9), 3,96 (3H, s, $ArOCH_3$ C-7'), 6.38 (1H, s, H-5), 6.49 (1H, s, H-5').

RMN^{13} C (CDCL3, 75 MHz) δ (ppm): 9.35 (C-9'), 24.0 (C-8'), 25.5 (C-9), 52.3 (C-7'COO$\underline{C}H_3$), 112.8 (C-5), 116.0 (C-5'), 193,8 (C-8).

In IR spectrum, the band observed at $1660cm^{-1}$, suggests the presence of a free OH in a carbonyl group of a ester ligation.

In the absence of free OH group, the ester carbonyl groups absorbs at $1750cm^{-1}$. Therefore, the $1580cm^{-1}$ band is an indicative of carbonyl of a aldehyde group linked to neighbouring OH group.

Crystal structures presented by this fraction, when treated with the mixture of solvents I, are comparable to those described for depsidone atranorine (Taylor 1976 b; Thompson 1968; Hale 1974). From the spectral analysis of P.T.B1, one can assign the following depsidone atranorine structure:



R = H - Atranorine
R = Cl - Cloroatranorine

Concerning the structure for the fraction P.T.B2, from the chromatographic behavios on solvent I, and crystal form, compared to the literature data (Ahmann et al. 1967), it suggests that the main component is the deposidone chloroatranonine.

The acetone extract, after the removal of the solvent, weighed 10.8g (27% of the original powder sample) and it was treated according to the method described by Ahmann (1967): it was dissolved in ethylether and extracted several times with solution of NAH_3 (5%). The aqueous extract was treated with H_2SO_4 (1M) until acid NaCO3 pH. The flocculent precipitate was separated by filtration and washed with water until neutral. The residue was dissolved in acetone and chromatographed. Only one component, P.T. AcI. was observed.
The ether extract obtained from fractionation was concentrated and crystallized - P.T.AcII, transparent crystals in needle form.

During the M.P. determination of the sample P.T. AcI, one observed a darkening of the crystal at 225°C and a decomposition between 230-240°C.

Following spectral data was obtained:

IV(KBr) $V_{máx}$ cm^{-1}: 3680 (banda larga, OH), 2980 e 2930 (f), 1655 (C=O), 1590 (aromático), 1460, 1420, 1380, 1205 e 1060.

RMN ^1H (Acetona-d_6, 300 MHz) δ (ppm): 2.05 (3H,$ArCH_3$), 2.08 (6H,$ArCH_3$), 6.28, 6.36, 6.54 e 6.63 4HArH).

The compound P.T.AcI was obtained in a small amount and its structure has not been determined yet.

P.T.AcII - This compound, crystallized from acetone solution, showed M.P. of 134-135°C and folowing spectral data was obtained:

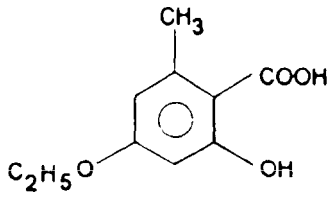
IV(KBr) $_{máx}$ cm^{-1}: 3305, 2930, 1640-1610, 1560, 1500, 1445, 1390, 1328, 1325, 1310.

RMN ^{1}H (Acetona-d$_6$, 300 MHz) δ (ppm): 1.39 (3H, t, j 7, 1 Hz, $CH_2\underline{CH_3}$), 2.47 (3H, s, $ArCH_3$), 4.38 (2H, q, j 7,1 Hz, $-CH_2CH_3$), 6.23, 6.28(2H, s, ArH).

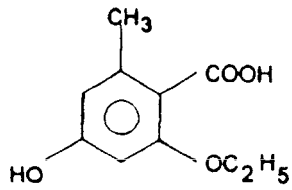
RMN^{13} C(Acetona-d$_6$, 75 MHz) δ (ppm): 13.3 ($-CH_2\underline{CH_3}$), 23.3 (Ar $\underline{CH_3}$), 60.8 ($ArCOOCH_2$), 100.5 (C-3), 104.3 (C-1), 111.2 (C-5), 143.3 (C-6), 162.1 (C-2), 165.3 (C-4), 171.4 (C-7).

EM m/e: [M] 196.15.

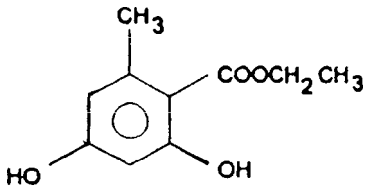
The ^{1}H-NMR spectrum shows' speaks at 1.39 and 4.38 ppm indicating the presence of the group CH_2CH_3, which can be present in P.T.AcII in the form of alkyl-aryl ether or as ether. Consequently, there are 3 following possibilities I, II & III:



(I)



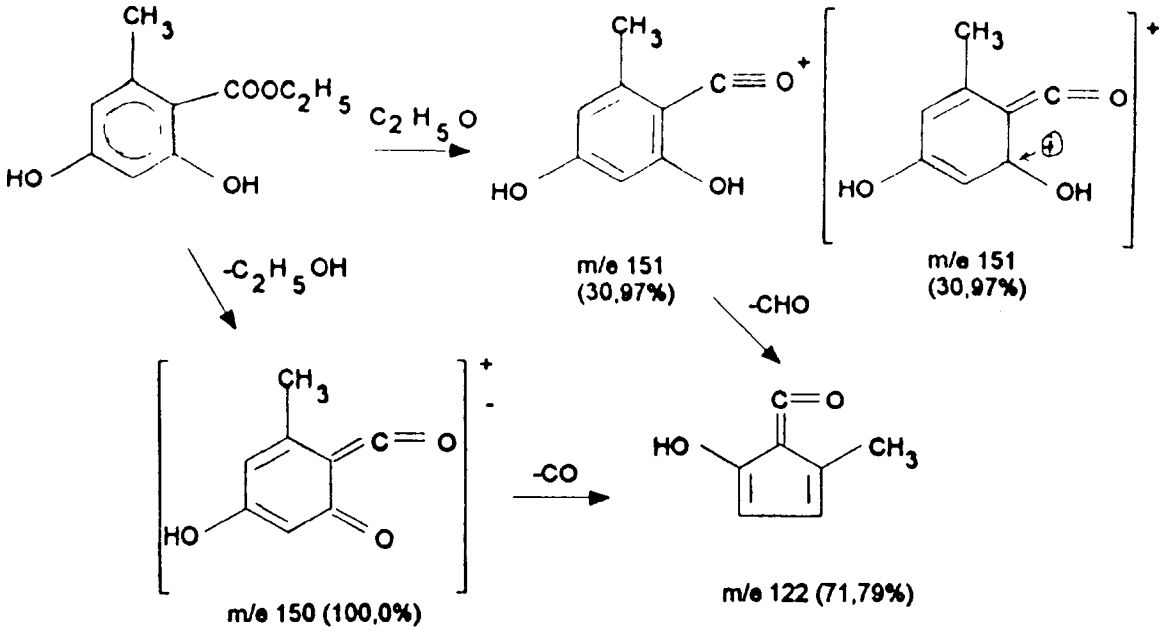
(II)



(III)

From the structure I one would expect a fragmentation pattern of water in the first stage, givin a product with m/e 178. The P.T.AcII would not present this signal.
In the case of the structure II, an expected fragmentation would in-volve a loss of CO_2, giving rise a ion m/e 152 whith occurs at a proportion of 3%. Therefore, structures I and II are less probable.

The mass spectrum of P.T.AcII presents fragmentation pattern compatible with the structure III.



Considering these analysis data and comparing the data published (Pouchert et al. 1993), one reaches the conclusion that the most reasonable structure for P.T.AcII is the structure III (ethyl orsellinate), 2,4-dihydroxy-6-methyl ethyl carboxylate.

However, this compound can be the result of esterification of orsellinic acid by the traces ethanol present during the process of isolation of the componentes. The orsellinic acid itself can originate from the hydrolysis of ester linkage of 2 aromatic components of Para-depside Lecanoric acid.

For the prove of the structure of P.T.AcII, 120g sample of lecanoric acid was added to ethanol and reflaxed for 6 hours.

After solvent evaporation, the residue was passed through silica gel column and eluted with chloroform and a mixture of chloroform. The compound eluted with 2% chloroform-acetone was erystallized in acetone and showed M.P.134-135°C ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra coincide with those obtained with P.T.AcII and litelature data (Pouchert et al. 1993).

Another explantion wold be that fractions P.T.AcI and P.T.AcII are decomposition products of original depsides present in the original sanple. The sample of *P.tinctorum* analysed was collected in a close to the region where forest fire had occurred.

In to get more precise information concerning second metabolites of *P.tinctorum* of the area, new lichen collections were made: A-I, A-II and A-III.

Samples were washed, dried and pulverized, yielding A-I-17.0g, A-II-13.0g and A-III-25.0g, and each sample was submitted to an exhaustive extraction Soxhlet with benzene and acetone. Extracts were concentrated in rotary evaporator. Silica gel TLC indicated a similarity in the composition among 3 samples.

Benzene extraction of each sample was treated with acetone in order to remove pigments. The while-colored residue, P.T.cB, was dissolved in chloroform and analyzed on silica gel TLC using solvent C. The spraying with methanol sulfuric acid and p-anisaldehyde/sulfuric acid revealed the presence of two the presence of components of R_f 0.57 and 0.42.

Microcrystallization procedure of P.T.cB in solvent I suggested the presence of atranorin and chloroatranorin with the first compound in a higher proportion.

Acetone extraction was dissolved in ethyl ether and treated 3 times of the solution of carbonate (5%) in ice bath. After this treatment, the ether phase was washed with water until neutral pH and treated with anhydrows sodium sulfato. Silica gel TLC revealed the presence of pigments in this sample . To the water phase containing the sodium carbonate (5%) and washed water 1N sulfuric acid was added to acid PH. The white precipitate was extracted with ether and ether solution was treated with anhydreus sodium sulfate. After solvent evaporation, the residue (P.T.cAc) was crystallized in acetone. Analysis indicated the presence of a component of R_f 0.52 and 0.49. The M.P. of this compound crystallized in acetone was>300°C. The yield of sample were: P.T.cAc(A-I) 2.4%; P.T.cAc(A-II) 5.3% and P.T.cAc(A-III) 10.2%.

For the structure elucidation, were taken spectral analysis of IR, ^{1}H-and ^{13}C-NMR and MS.

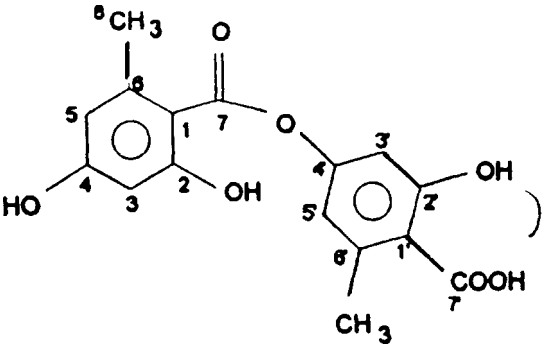
IV(KBr) $V_{máx}$ cm^{-1}: 3540, 3460, 2980, 1658, 1640, 1618, 1585, 1490, 1412, 1320, 1290, 1260, 1215, 1180 e 1152.

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ (ppm): 2.33, 2.35, (6H, s, $ArCH_3$), 6.21 (2H,ArH), 6.59 (2H,ArH), 10.02 (1H,ArOH), 10,48 (1H,ArOH).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ (ppm): 21.0 (C8), 21.4 (C8'), 100.5 (C3), 107.8 (C3'), 109.9 (C5), 114.8 (C5'), 116.6 (C1'), 152.3 (C4'), 158,8 (C2'), 160.2 (C2), 161.2 (C4), 167.2 (C7), 170.7 (C7).

EM m/e: 318.15 (M 1,09%), 168.0 (47.94), 151.0 (49.13), 150.0 (100.0), 124.0 (39.29), 123.0 (34.27), 122.0 (96.59).

The δ values observed in NMR spectra of P.T.cAc, are compatible with data given by Sakurai et al. (1987), for lecanoric acid.



Lecanoric acid

The chromatographic behavior, as well the results of crystal forms obtained by solvent I from P.T.cAc component, are similar to those data given to lecanoric acid (Culberson 1972; Culberson et al. 1981; White et al. 1985; Taylor 1967a 1967b).

Chemical analysis of *Parmotrema tinctorum* collected in savana of Mato Grosso do Sul, revealed the presence of atranorine, chloroatranorine and lecanoric acid. The

results indicative that samples localized in Mato Grosso is an ecotype which differs from those of State of Paraíba (Brazil), Costa Rica and Japan (Vicente et al. 1984; Sakurai et al. 1987) but similar to those found in Mississipi (USA) and analyzed by Ahmann and Mathey (1967).

Ethyl orselinate may be considered being an artifact due to the process of isolation and purification of lecanoric acid.

Parmotrema dilatatum (Vain.) Hale

The collected lichen resulted in 33.0g of powder which was submitted to exhaustive extraction with benzene and acetone. The concentrated benzene extract, after standing still, resulted in sedimented white crystals. The purification of this fraction (P.d.01) was done by acetone treatment at room temperature. The TLC analysis with solvents A and B, after chloroform crystallization, indicated the presence of only one component. M.P. observed was 194-195°C. The spectral data IR, ^{1}H-NMR

Analysis P.d.01 when compared to those cited in the literature (Huneck 1968, Hylands 1985) allows to attribute the structure to depside atronorine. The crystalline sturcture resulting from solvent I treatment of Pd.01 is similar to that describe by Taylor (1967b), Thompson (1968) and Hale (1974) and attributed to depside atronorine.

TLC analysis of benzene extract, after removal of atranorine, showed the presence of a component with chromatographic characteristics of usnic acid. The microcrystallization of the extract in solvent III indicated crystalline forms charateristics of this acid (Thompson 1968 and Taylor 1967b). Due to small proportion of this component present in the extract, its final structural determination was not accomplished.

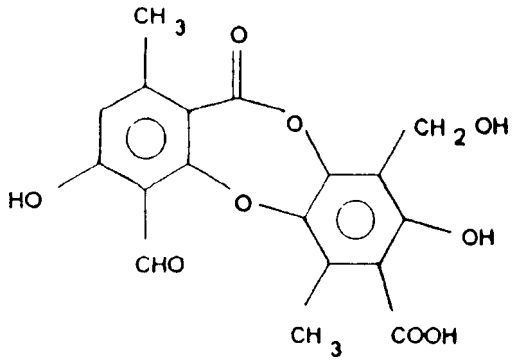
From the concentrated acetone extract, a white amorfous solid was isolated. After acetone and acetone/water (80%) presence purification, a fraction (P.d.02) was isolated. TLC analysis in solvent A indicated the presence of only one component.

The fraction purified in acetone showed M.P. 220°C & IR spectra presented following bands:

DE KBR apresentou bandas em $V_{máx.}$ cm^{-1}: 3408 (OH), 2905 (CH aromático), 1758 (C=O), 1655 (0-hidroxi-aldeído), 1448 e 1388 (CH_3). Os espectros de RMN 1H e de ^{13}C obtidos em 300 e 75 MHz respectivamentes com a amostra dissolvida em DMSO-d6 apresentaram os seguintes valores de δ expressos em ppm: 2.37 e 2.40 (6H, 2 x CH_3), 4.59 (2H-CH_2OH), 6.80 (1H, ArH), 10.56 (1H, ArCHO); 14.5 (C9'), 21.5 (C9), 54.3 (C8'), 111.9 (C3), 112.4 (C3'), 112,5 (C1), 116.6 (C1'), 117.1 (C5), 129.5 (C6'), 141.4 (C5'), 144.7 (C4'), 152.1 (C6), 154.6 (C2'), 161,3 (C7), 163.9 (C4), 164.0 (C7'), 170.3 (C2), 191.8 (C8).

Mas spectrum showed fragmentation pattern typical of depsides & a molecular ion (M+) 374.1.

Those spectral data allow us to attribute the structure of protocetraric acid to the fraction P.d.02. The chromatographic behavior and crystal forms presents in solvent A are comparable to the literature data of this acid (Culberson et al. 1970, Taylor 1967, Tompson 1968, White 1985).



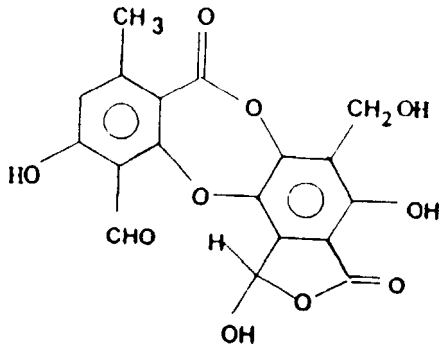
Protoceratric acid

Parmotrema cf. delicatulum (Vain.) Hale

Collected in Piraputanga. After cleaning, resulted in 11.0g of powder which was submitted to an exhaustive benzene and acetone extraction. Concentrated benzene extraction was treated with ethanol in order to remove pigments. From this process, resulted a yellow residue which was treated with chloroform/ethanol with 1.69% yield. It had M.P. 202°C and showed a chromatographic behavior identical to the usnic acid standard.Microcrystallization process resulted also in crystals compatible to those of usnic acid.

From concentrated acetone extraction, a white powder was obtained as a sediment (10.5% yield). The purification of this fraction (P.del.Ac) was done with acetone and acetone/water (80%). This fraction was identified as salazinic acid, a deposide derivative of β orcinol containing a lactol ring. The identificatin was made based on following spectral data:

Um anel lactol. A identificação foi feita com base nos seguintes dados espectrais: IV(KBr) V. $_{máx.}$ cm^{-1}: 3590 (OH livre), 3300 (OH ligado), 1772, 1630, 1558, 1497, 1450, 1380, 1300, 1260, 1215, 1200. RMN 1H (DMSO-d$_6$, 200 MHz) δ (ppm): 2.33 (3H, ArCH$_3$), 4.54 (2H, ArCH2OH), 6.70 (1H, ArH0, 6.75 (1H lactol), 8.19 (1H, OH lactol), 10.34 (2H, ArCHO e ArOH), 11,93 (1H, ArOH). RMN ^{13}C (DMSO-d6, 50 MHz) δ (ppm): 21.6 (C8), 52.9 (C9'), 95.3 (C8'), 109.8 (C1'), 110.8 (C3), 112.1 (C1), 117.6 (C5), 23.6 (C3'), 137.5 (C6'), 138.3 (C5'), 148.3 (C4'), 152.4 (C2'), 153.0 (C6), 160.4 (C7), 163.7 (C 7') 166.0 (C2), 192.9 (C9). EM m/e (%): 388.0 (M,9.59), 370.0 (M-H2O, 68,27%). Análise elementar: C 55,88%, H 3,13%, O 40,99%. p.f. 264-265°C (acetona-H2O).



Salazinic acid

Color reaction carried out with *P. delicatulum* samples collected by Vainio em 1885, indicated the presence of atranorine, salazinic acid and usnic acid (Hale 1965). In the sample collected in Mato Grosso were found salazinic and usnic acids but atranorine was not observed.

Parmotrema cf. miranda (Hale) Hale

The collected sample, after cleaning resulted in 22.5g of powder which was submitted to an exhaustive benzene and acetone extraction in Soxhlet. The concentrated benzene extraction was treated with ethanol in order to remove pigments and the resulting residue was purified by various chloroform/ethanol treatment. The purified fraction (P.mir.B) was identified as usnic acid based on chromatographic behavior and microcrystallization reactions and compared with the standard. The yield was 0.836%.

From concentrated acetone extract resulted a sediment of white color which was by purifid by acetone and acetone/H_2O (80%) treatment (yield: 7%).
Its behavior on TLC with solvents A and B, as well as IR and H-NMR spectral data, coincide with those of salazinic acid.

These results agree with data published by Hale (1965) on this lichen. Hale (1965) by color reaction of thallus identified usnic and salazinic acids in P. miranda samples.

Parmotrema cf. flavescens (Kremplh.) Nyl.

The collected lichen sample resulted in 24.0g of powder and it was submitted to an exhaustive benzene and acetone extraction in Soxhlet. Resulting extracts were concentrated and submitted to treatments as described in previous pages. From benzene extract resulted 1.12% of usnic acid identified by TLC and microcrystallization.

From acetone extraction it was obtained 9.42% of salazinic acid identified by chromatographic behavior, microcrystalo obtained using solvent III and also from IR and ^{1}H-NMR data.

Hale (1965) described the results obtained by color reactions done with samples from Central and South America and Mexico, indicating the presence of usnic, salazinic acids and atranirine.

P. flavescens collected in Mato Grosso shows the presence of usnic and salazinic acids. No presence of atranorine was detected.

Pseudoparmelia sphaerospora (Nyl.) Hale

The collected sample, puliverized after cleaning, resulted in 33.0g of powder which was submitted to an exhaustive benzene (5,6L) and acetone (5.3L) Soxhlet extraction. Both extracts were concentrated by rotavapor giving 4.3g of residue (13.2%) from benzene extraction and 3.5g (10.6%) from acetone extraction.

Benzene extraction - After drying, the extract was treated with chloroform with an attempt to separate components based on solubility. This process gave a partial separation in chloroform solution. This white solid (P.sph A) was purified by a successive treatment with acetone. In order to separate 2 main components present in the benzene extract (a white powder and a yellow powder), the sample was passed throwgt a silica gel column. 1.0g of benzene extract was applied on the column and the elution was done using the gradient of polarity with hexane, chloroform, acetone and methanol. 96 fractions of 125ml were colected. Fractions were concentrated in rotary evaporator and TLC using the solvevt B. The analysis of initial fractions indicated the presence of pigments and aliphatic compounds. Remaining fractions presented white and yellow components which did not separate by this process. Due to difficulty in separating the components by this column procedure, all fractions were combined in order to try other methods.

Various attempts were made in order to separate the components based on solubility in various solvents but results obtained were not satisfactory. One procedure which resulted in a satisfactory separation of the yellow component was the silica gel prepatative column impregrated with 0.1N oxalic acid, using the solvent C.

After the elution with acetone, the extract was dried and the yellow component (P.sph.B) was crystallized in chloroform/acetone. The yellow crystals in needle forms had a M.P.256-258°C. This component constitutes 6.6% of the sample.

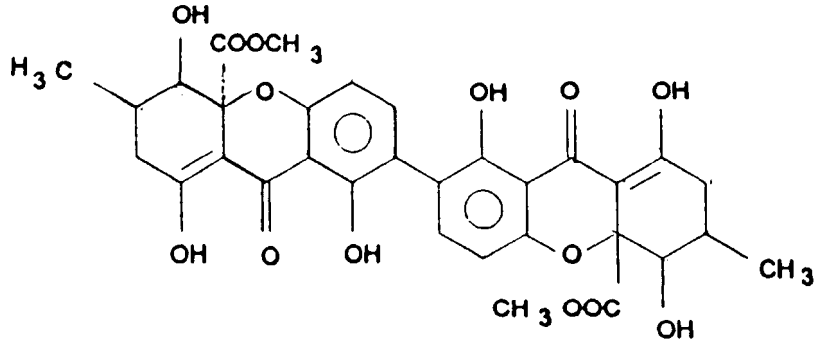
IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and mass spectra were obtained. Analysis of these data and the comparision with those published by Yosioka et al. (1972), indicate that this crystal corresponds to secalonic acid.

IV(KBr) V. $_{máx.}$ cm^{-1}: 3500 (OH), 2925, 2915, 1870, 1730 (COOCH3), 1610 (C=O), 1585 e 1560 (aromático), 1435, 1330, 1230, 1160, 1130, 1075, 1035, 985.

RMN 1H (DMSO-d$_6$ 200 MHz) δ (ppm): 1.04 (6H, d j 5.92 Hz, 2 x CH$_3$), 2.30 a 2.64 (6H, m, 2 x CH-CH$_3$), 3.61 (6H, s, 2 x -COOCH$_3$), 3.82 (2H, d j 7.48 Hz, 2 x CHOH), 6.03. 6.05, 6.61, 6.65 (4H, ArH), 11,61 (2H, ArOH), 13,60 (2H,ArOH).

RMN ^{13}C (DMSO-d6 50 MHz) δ (ppm): 17.9, 30.1, 36.0, 39.2, 53.0, 75.4, 85.38, 101.9, 106.5, 107.7, 140.4, 158.7 ,159.1, 170.2, 178.4 e 186.7.

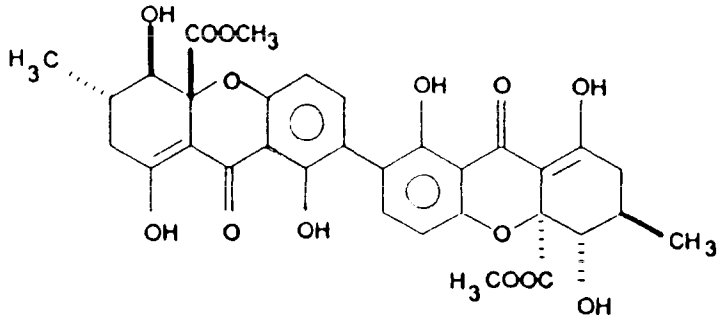
Espectro de Massas, m/e (%): 638,30 (M, 14,24), 620,30, (M - H2O, 0,910, 579,20 (M - COOCH$_3$, 100), 260,0 (M/2-COOCH$_3$, 16,08).



Secalonic acid

Although the stereochemistry of secalonic acid isolated from *P. sphaerospora* has not been determined, the integration of all protons and the comparison of chemical shifts with the data, published Andersen et al. (1977) for secalonic acid D allow us to establish that this yellow crystal has de same structure or its enantiomeric form, secalonic acid A.

In view of the fact that secalonic acid D has not yet been found in lichens but secalonic acid A has been found in various lichens, it is likely that the present crystal is the latter. There fore, from available information, the fraction P.sph.B is more likely to be secalonic acid A.



Secalonic acid A

Acetone extraction: From concentrated acetone extract one component, a white powder was isolated. The purification was done with acetone and acetone/water (80%).
P.sph.Ac, present in a proportion of 10.0%, with M.P. 287°C.
From chromatographic analysis and M.P. value, one observed that P.sph.Ac and P.sph.A showed the same behavior, there fore, they should represent the same compound. Following spectral data were obtained:

IV(KBr) $V_{máx.}$ cm^{-1}: 3470, 3410, 1980, 2950, 2930, 2860, 1755, 1710, 1628, 1610, 1565, 1490, 1485, 1455, 1370, 1325, 1295, 1250 e 1220.

RMN 1H (DMSO-d_6, 300 MHz) δ (ppm); 2.18 (3H, s, $ArCH_3$), 2.26 (3H, s, $ArCH_3$), 2.42 (3H, s, $ArCH_3$), 3.87 (3H, $ArOCH_3$), 6.68 (1H, d j 8.0 Hz, ArH), 6.89 (1H, lactol), 8.34 (1H, Oh lactol, d 8.o Hz), 10.04 (1H, s, ArOH).

RMN 13C (DMSO-d6, 75 MHz) δ (ppm); 8.6 (C-9), 9.5 (C-9'), 20.8 (C-8), 56.2 (OCH3), 95.6 (C-8'), 109.2 (C-1'), 110.9 (C-3), 112.6 (C-10, 114.6 (C-5), 120.4 (C-3'), 135.5 (C-6'), 138.0 (C-5'), 141.9 (C-6), 148.3 (C-4'), 151,3 (C-2'), 161.7 (C-7), 161.5 (C-4), 167,1 (C-2).

Espectro de Massas m/e: 372,15 (M, 29,25%), 354,15 (43,13), 328,0 (100).

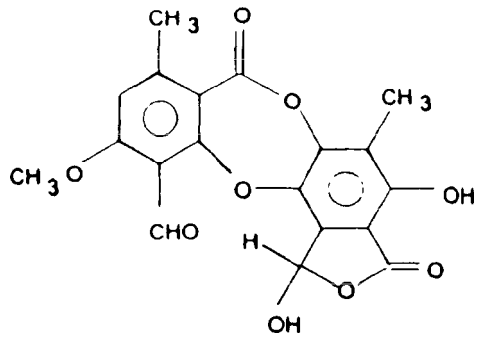
In the IR spectrum of P.sph.A, a sharp band at 3410cm^{-1} is characteristic of the free OH group, i.e., not H-bonbed, whereas bands at 1755 and 1710cm^{-1} are chracteristic of lactones of depsides. The band at 1610cm^{-1} is indicative of C=0 with intramolecular ligation and 1560cm of aromatic ring.

Mass spectra shows fragmentation pattern suggestive of the presence of OH near carbonyl groups which facilitate the elimination of water molecule. Therefore, the ion M^+ 372.1 after loosing one water gives rise to ion M^+ - H_2O (354.1) the presence of carboxyl

group allows also the elimination of CO_2 from the ion M^+, producing the $M^+ - CO_2$ (328.0). However, the compound P.sph.A is not soluble in $NaHCO_3$ solution, which indicates the possible absence of free carboxyl.

^{13}C-NMR spectrum does not show the signal corresponding to a free aldehyde (δ 190.0-197.0 ppm). The absence of free aldehyde groups was confirmed by the negative reaction observed with p-phenylenediamine.

According to the spectral data, it is possible to assing the structure of hypoconstictic for the compound P.sph.A



^{1}H-NMR signals present are compatible to those published by Keogh (1978) for hypoconstictic acid and ^{13}C-NMR signals agrre with values cited by Sudholm et al. (18) for depside and lactol ring.

Chemical analysis of sample collected in Vila Piraputanga allowed the identification of 2 main components, one of them a yellow pigment, identified as secalonic acid. To another one was assigned the structure of hypoconstictic acid.

Atranorine and other acids described by Hale (1976) were not detected in the present sample.

Pseudoparmelia hypomitta (Fée) Hale

Collected sample resulted in 25.0g of powder, which was treated with acetone in Soxhet. This extraction process was repeated 4 times and after solvent evaporation, extracts were chromatographed. First, second and third extractions showed the same chromatographic behavior and therefore were put together - 2.9g (sample p.h.01). The 4th extraction (acetone) showed a different composition and it was maintained separated (AcIV) and weighed 0.131g.

The fraction P.h.01 was treated with ethanol at room temperature, which allowed separation of the pigment. From the fraction P.h.01 resulted a yellow residue, designated F01. The ethanol fraction was designed P.h.02.

The silica gel TLC of F01 indicated the presence of one major component and others in small proportion which after chromatographic analysis revealed characteristics of an aliphatic compound. The purification of fraction F01 by fraction crystallization did not give satisfactory results. Purification using silica gel column chromatography did not work either.

The purification of F01 was carried out by preparative chromatography of silica gel TLC impregnated with 0.1N oxalic acid, initally using the solvent mixture D. The main components was eluted with acetone and after de evaporation of the solvent it crystallized in a form of yellow needles in chloroform/acetone and showed M.P.264-265°C.

The fraction P.h.02 (0.96g) was chromatographed in silica gel column. The elution was done with chloroform, ethyl acetate and methanol. 182 fractions of 10ml each were collected. Fractions with similar chromatographic behavior were mixed. Due to small quantily present, it was not possible to isolate and purify the components.

The fractions F01 showed spectral data (IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and MS) equal to those presented by secalonic acid isolated from *P.sphaerospora*.

The present result is in agreement with Hale's (1986) observation on the presence of a yellow pigment in genus *Pseudoparmelia* to which he assigned secalonic acid structure. This fact has a chimiotaxonomic meaning for identification of genus *Pseudoparmelia*

Usnea aff. meridionalis ***Zahlbr.***

The sample was collected and after selection and cleaning was pulverized. the powder (100.0g) was sequentially treated exhaustively with benzene and acetone in Soxhlet. Concentrated benzene extract (4.7g) was treated with ethanol in order to remove pigments. Silica gel TLC analysis of the brute extract reveled the presence of onky one component. The purification of the extarct was done with chloroform and ethanol. the purified component (U.M.B) formed yellow crystals M.P. 202-203°C. Spectral analysis (^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR) and chromatographic behavior were sufficient to identily the compound UMB as usnic acid. Optical rotation observed was + 499.5 °. This acid constitutes 0.9% of the sample.

After the removal of the usnic acid, the benzene extract (aproximately 3.0g) was chromatographed in silica gel column impregnated with 0.5N oxalic acid. The elution was done by polarity gradient, using benzene, acetone and methanol. 85 fractions of 125ml each were collected. The fractions 5,6 and 7, eluted with benzene, contained usnic acid. The fractions 22-26, eluted with benzene/acetone 8:2v/v showed a main component mixed with pigments. The removal of pigments was done with acetone. Fractions were mixed (UM 2226) which resulted in a white powder. The crystallization was done with acetone/water 80%. Fraction 27 and 28 eluted with the same solvent mixture benzene/acetone 8:2v/v, showed the composition as U.M 2226, but much less pure.

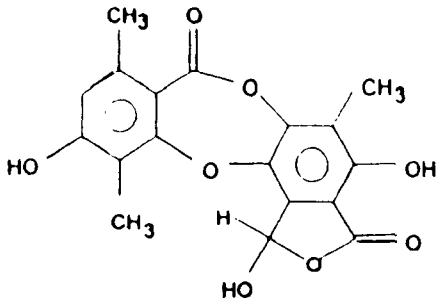
The fraction U.M. 2226 had M.P. 275°C with decomposition IR spectrum presented absorptions in α_{max}cm-1: 3425 (OH), 176 (lactone), 1745 (C=O depside), 1685 (C=O aldehyde). ^{1}H-NMR (200 MHZ) of the sample dissolved in DMSO-d_6, showed signals in: 2.18 (3H, $ArCH_3$), 2.48 (3H,$ArCH_3$), 3.90 (3H,$ArOCH_3$), 6.61 (1H,ArH), 7.08 (1H, acetal, - CHOH exchangeable with D_2O), 10.17 (1H, ArOH, exchangeable with D_2O), 10.46 (1H, ArCHO).

Based on these data, it is possible to suggest depside structure to UM 2226, having an acetal group, 2 methyl groups and one methoxy group linked to ring, one aldehyde group and one phenolyc hydroxyl.

The MS spectra of U.M. 2226 presented m/e (%): 387[M+1] (15.08), 386[M+] (66.01), 368 (58.03), 340 (45.09), 193 (54.80), 191 (81.54).

IR, ^{1}H-NMR and MS spectra obtained are in agreement with those assigned to stictic acid by Ingolfsdottir et al. (1986).

The crystalline structure resulting from microcrystallization of U.M. 2226 in solvent I, are similar to those described by Thompson (1968) and Taylor (1967a) for stictic acid.



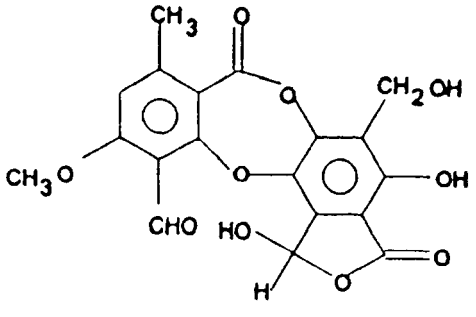
Stictico acid

Acetone extract: Concentrated acetone extract gave a white powder sediment which was separated by centrifugation - U.M.Ac. This fraction was treated with acetone for pigment removal. Chromatographic behavior and ^{1}H-NMR of U.M.Ac allow us to identify as protocetraric acid.

The supernatant fraction of the centrifugation was chromagraphed and showed a couple of components. Among these, only 2 are present in major proportion: stictic acid and another one smaller R_f value.

The second component was separated by preparative silica gel TLC, using A (U.M.Ac 2). The ^{1}H-NMR spectrum obtained with the sample dissolved in DMSO-d_6 presented following signals: (δ) 2.25(3H,ArCH_3), 3.67(3HArOCH_3), 4.34(2H,ArCh_2-), 6.3(1H,ArH), 6.8(1H,lactol), 10.17(1H,ArCHO)ppm.

Based on these data, one can suggest constictic acid to the component U.M.Ac2.



Constictic acid

For the confirmation of structure, it is necessary to obtain ^{13}C-NMR and MS data, which will require more samples.

The remaining acetone extract was chromatographed on silica gel TLC together with the standards: nortistic, salazinic, stictic and hypostictic acids and acetone extract of *Parmotrema crinitum* (Ach.) Hale. According to Culberson (1981), *P. crinitum* contains

atranorine, acids stictic, megaziaic, constictic, criptostictic, traces of hypostictic and norstictic acids and other compounds not identified. Chromatographic analysis (R_f values, color acquired after development) compared to standards and literature data (Culberson et al. 1981, White et al. 1985), allow us to suggest that following acids are present: hypostictic, criptostictic, salazinic and constictic, besides stictic acid in the acetone of *U.meridionalis*.

Usnea sp.

The sample was collected in Vila Palmeiras. The lichen powder (24.0g) was extracted with benzene (1.5L) followed by acetone (1.2L). After solvent evaporation in rotary evaporator, the residue of benzene extraction was 1.6g and acetone 0.6g. Silica gel TLC analysis indicated the absence of lichenic acid in the acetone extract.

Benzene extract was fractionated in silica gel column with dichromethane, chloroform, chloroform/acetone 1:1, acetone and methanol. Fractions resulting of the chloroform elution were combined, concentrated and chromatographed again in silica gel and eluted with polarity gradient using dichromethane, dichromethane/chloroform, chloroform, chloroform/acetone and acetone. Fractions eluted with chloroform/acetone 20-60% contained a component which was identified as usnic acid. The identification was done through comparative chromatography with standard, comparative microcrystallization in solvent IV and M.P. determination. The component presented $[\alpha]$ + 494.5°C at 23°C ($CHCL_3$).

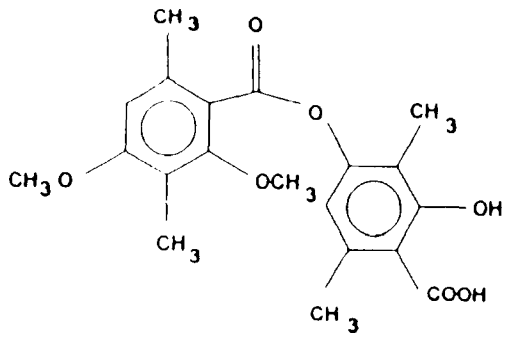
Fractions eluted with chloroform/acetone 1:1 were combined, concentrated and chromatographed again in silica gel and eluted with chloroform and gradient chloroform and acetone. Fractions eluted with chloroform/acetone 2% showed a white crystal which was purified by successive crystalization in chloroform/acetone - *U.sp.* with M.P.194 -195°C and following spectral data:

IV(KBr) $V_{máx.}$ cm^{-1}: 3060, 2980, 2820, 2620, 2560, 1745, 1645, 1580, 1500, 1470, 1452, 1400, 1395, 1325, 1140, 1065, 990, 895, 850, 840, 790, 600.

RMN ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz) δ (ppm): 2.13 (6H, s, $ArCH_3$), 2.44 (3H, s, $ArCH_3$), 2.61 (3H, s, $ArCH_3$), 3.83 (3H, s, $ArCH_3$), 3.89 (3H, s, $ArOCH_3$), 6.67 (1H, s, ArH5), 6.74 (1H, s, ArH5').

RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz) δ (ppm): 8.7 (C9'), 8.9 (C9), 19.5 (C8), 55.8 ($C4OCH_3$), 61.7 ($C2OCH_3$), 107.5 (C5), 113,4 (C3'), 115.7 (C5'), 116.0 (C1'), 116.1 (C3), 119.4 (C1), 134.8 (C6), 139.1 (C6'), 152.4 (C4'), 159.5 (C5), 161.3 (C2'), 167.5 (C7), 173.1 (C7').

Chemical shifts presented by the component *U.sp.* are comparable to these reported by Huneck (1968) and Sudholm (1981) for difractaic acid.



Difractaid acid

This conclusion is reinforced by observation of crystal forms resulting from microcrystallization of *U.sp.* in solvent IV which are comparable to those described by Taylor (1967b) for difractaic acid.

Based on chemical analysis made on *Usnea sp*, one concludes that usnic acid difractaic acid are phenolic derivatives present in this lichen.

Heterodermia cf. microphylla (Kurok) Scorepa

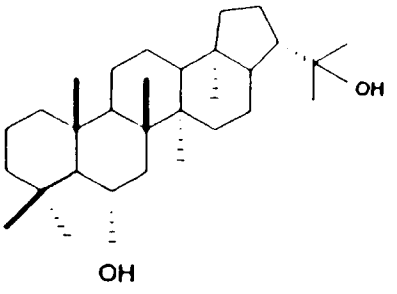
Collected sample, after selection and cleaning, was pulverized giving a powder of 4.9g. This product was subjected to an exhaustive chloroform and acetone extraction in Soxhlet. The chloroform extract was concentrated after the removal of pigments (acetone treatment) and chromatographed in silica gel TLC, with the standards. As main components, depside atranorine and triterpene zeorin were identified.

A microcrystallization in solvent I produced crystal forms chracteristic of atranorine and zeorin, confirming chromatographic analysis data.

By preparative TLC impregnated with 0.1N oxalic acid and solvent E, two components were separated. Atranorine was obtained in a quantify sufficient to run the ^{1}H-NMR, confirming the structure. Zeorin sample was not enougt for spectral analysis.

Acetone extract showed only pigments and it was not analyzed.

According to Kurokawa (1962) *Anaptychia microphylla*, actually *Heterodermia microphylla*, contains, occasionally, nortistic and salazinic acids, together with atranorine and zeorin. Swiscow and Krog (1988) and Galloway (1985) have described *Heteroderma microphylla* as a lichen containing zeorin. The present sample has shown the presence of depside atranorine and triterpene zeorin. Nortistic and salazinic acids were not detected.



Zeorin

Biological Assays

Fungicidal Activity

Ethyl orsenilate, usnic acid, atranorine and difractaic acid had inhibitory effect on the growth of *C.sphaerospermum*. Difractaic acid presented reduced activity but usnic acid, atranorine and ethyl orselinate showed a strong activity. Other compounds tested did not show fungicidal activity under conditions described here. No quantitative inhibitory effect was carried out.

These results reveal the viability of research in this class of compounds with other fungi in order to evaluate the use of these compounds and their derivatives, in the treatment of diseases caused by these organisms.

Citotoxic Activity

Among all compounds tested, usnic acid was the most active (LD_{50} 3.70ppm), followed by protocetraric acid > 50.0 ppm; atranorine 74.8ppm, ethyl orselinate > 105.0ppm secalonic acid > 125.0 ppm; hypostictic and lecanoric acid > 250 ppm; dif, ractaic and salazinic acids > 300.0 ppm the compounds, acids protocetraric, secalonic, hypostictic, lecanoric, difractaic and salazinic, due to their low solubility in water, presented difficulty in carry out the bioassay.

Discussim and Conclusion

In this work, 10 lichens species were analyzed, belonging to genus *Parmotrema* (5), *Pseudoparmelia* (2), *Usnea* (2) and *Heterodermia* (1).

Ten different compuonds were isolated and identified, all belonging to the class of secondary metabolites. The identification of these compounds were based on IR, NMR and MS spectral analysis and on chromatographic and also on microcrystallization reactions. Besides these 10 compounds, chloroatranorine and zeorin were identified only by chromatography and microcrystallization reactions. Ethyl orselinate, although had been isolated from.*P. tinctorum*, it was not included as secondary metabolite of this lichen but as an artifact.

The analysis of a *P. tinctorum* sample resulted in the isolation of ethyl orsenilate and another fraction, but, probably, it was a degradation product of lecanoric acid or atranorine.

According to Hale (1965), *P. tinctorum* from Canary Islands, showed atranorine and lecanoric acid in its composition and were determined through coloring reaction in thallus. Ahmann et al. (1967) isolated from a sample from Mississipi atranorine, chloroatranorine and lecanoric acid, whereas Sakurai et al. (1987) isolated from a japanese sample ortho-depside isolecanoric acid. Vicente et al. (1984) analyzed by HPLC phenolic constituents of 2 ecotypes of

P. tinctorum. One of samples was collected in Brazil (State of Paraíba) and it showed the presence of orselinic acid, orcinol, norstictic acid, atranorine, evernic acid and one nonidentified compound. Norstictic acid was the major component. Another sample, an ecotype of Costa Rica presented orselinic acid, orcinol, norstictic acid, atranorine, evernic acid, lecanoric acid and fumarprotocetraric acid.

Considering the fact that the sample of *P. tinctorum* analysed was collected in a area relatively close to a local where forest fire had occured, it is possible that ethyl orselinate and another compound not identified, have resulted from thermal decomposition of secondary metabolites present in this lichen.

Although the secondary metabolites of lichen are sufficiently stable under de conditions of the field and storage em herbarium, few compounds may undergo particial decomposition in the storage along the years. This is the case of samples containing aslazinic acid or norstictic which become red. Another example is the tamnolic acid which easily undergoes decarboxilation giving decarboxy tamnolic acid which purifies with tamnolic acid and it can be easily dected by chromatography. Certain ester e.g., fumarprotocetraric (fumaric acid + protocetraric acid), galbinic (acetic acid + salazinic acid) and others are easily hidrolyzed and resulting acids are found with ester and it can be a source of artefact of storage, extraction or analytical procedure (Culberson et al.1977).

Hylands et al. (1985) isolated β-methyl orselinate from *Stereocaulon alpinum* and considered it as a possible artefact product of the hydrolysis of atranorine. Chloroform contains ethanol as stabilizer and during the extraction process this solvent can alcoholize. In order to prove this fact, an experiment was carried out in which atranorine was heated with chloroform containing varying proportions of ethanol & found out that in all cases, even in the presence of traces of ethanol, atranorine is alcoholized. The authors suggest that the isolation of β-methyl orselinate as metabolite of natural occurrence in *Parmotrema tinctorum* may not be a corrsct information, since the method of extraction involve the use of chloroform as solvent (Murty 1960, Hylands et al. 1985).

Ethyl orselinate is cited as a metabolite of *Roccella fuciformis* DC and it was isolated by Treating lichen with chloroformis under heat (Aberhart et al. 1969). This . compound can also be an artifact of alcoholyses of eritrine present in *R. fuciforms*. Eritrine is a derivative of lecanoric acid with critritol.

There is no citation in literature occurrence of ethyl orselinate in *P. tinctorum*. Therefore, this product can be an artifact resulting from alterations in metabolites due to heat of forest fire or process which involve the use of ethyl ether during the purification. A proof that ethyl orselinate is not a natural metabolite of *P. tinctorum* but an artifact, was done by analyzing 3 samples of this lichen collected from the same area, but the method of purification of lecanoric acid were done in ice bath. From these samples were isolated atranorine and lecanoric acid. Therefore, ethyl orselinate obtained from *P. tinctorum* can be an artifact resulting from the esterification of orsenilic acid during the purification process. Orselinic acid can result of the hydrolysis of ester bond 2 aromatic units of lecanoric acid.

From *P. dilatatum* were isolated atranorine and protocetraric acid. Usnic acid was also identified, but only traces. The sample from Mato Grosso do Sul shows the same composition as the herbarium sample collected by Vainio in 1890 in Minas Gerais and reviewed by Hale (1965). The composition cited was based on color reaction on thallus.

Parmotrema cf. delicatulum, Parmotrema cf. miranda, and *Parmotrema cf. flavescens*, present the same composition, and were identified usnic acid and salazinic acid. According to Hale (1965), *P. delicatulum* e *P.flavescens* contain atranorine, usnic acid and salazinic acid, but *P. miranda* contains only usnic and salazinic acids. *P. delicatulum* and *P. flavescens* samples analyzed did not show the presence of atranorine among secondary metabolites. The composition of lichenic acids cited by Hale (1985) of these 3 species, was determined by color reaction of thallus of herbarium sample.

There is no reference to the occurrence of ethyl orselinate in *P. tinctorum* in literature. Therefore, the product observed in our product can be an artifact due to heat from forest causing metabolite alterations or can be due to the use of ethyl ether during the process of purification. To prove that ethyl orselinate is not a natural metabolite of *P. tinctorum* but an artifact, three samples were taken from the same area the purification process of lecanoric acid was done in water bath. From these samples, were isolated only atranorine and lecanoric acid. Therefore, ethyl orselinate obtained from *P. tinctorum* can be an artifact resulting from the esterification of orselinic acid during the process of lecanoric acid with ether. Orselinic acid can result from the hydrolysis of ester linkage between two aromatic groups of lecanoric acid.

From *P. dilatatum* were isolated atranorine and protocentraric acid. Usnic acid was also identified, but in trace amount. The sample collected in Mato Grosso do Sul shows the same composition as those samples collected by Vainio (1890) from herbarium in Minas Gerais and reviewed by Hale (1965). The cited composition was based on color reaction observed on thallus.

Parmotrema cf. delicatulum, Parmotrema cf. miranda and *Parmotrema cf. flavescens* showed the same composition: usnic acid and salazinic acid. According to Hale (1965), *P. delicatulum* e *P. flavescens* sample analysis showed no presence of atranorine as a component of secondary metabolites. The composition of lichenic acids reported by Hale (1965) for these 3 species, was determined by color reaction in thallus of herbarium samples.

From *Pseudoparmelia hypomilta* was isolated secalonic acid. This compound is known as a fungus metabolite and with rare occurrence in lichens. This acid has also been isolated from *Pseudoparmelia sphaerospora*. From this species was isolated besides secalonic acid, a depside identified as hypostictic acid.

Secalonic acid is known as fungus metabolite and presently 7 isomers are known: A, B, C, D, E, F, & G (Budavari 1989). However, it has also been isolated from few species of lichens: secalonic acid A from *Parmelia entotheiochroa* Hue and secalonic acid C from *Cetraria ornata* Müll. Arg. (Yosioka et al. 1968,1972).

The genus *Pseudoparmelia* Lynge covers only 4 tropical species: *P. cyphellata* Lynge, *P. chapadensis* (Lynge) Hale, *P. hypomitta* (Fée) Hale e *P. sphaerospora* (Nyl.) Hale. According to Hale (1986) all 4 species present a pale yellow medular pigment, not identified, but supposed to be secalonic acid.

Hale (1976) examined *Pseudoparmelia sphaerospora* sample of various regions, including Brazil, using coloring test, concluded that this lichen can contain atranorine, stictic acid, norstictic acid, gyrophoric acid, unknown "quintaria" and a yellow pigment in various combinations. He also mentions that the majority of samples group about 20% of sample, showed the constituting presence of atranorine, stictic and a pigment. Only few samples had atranirine and unknown "quintaria" with stictic and norstictic acids or with gyrophoric acid.

Derivatives of stictic acids (constictic, methylstictic, cryptostictic and hypostictic acids), norstictic (connorstictic), salazinic (hyposalazinic, consalazinic), are referred as "quintaria' in chemitaxonomy.

The stereochemistry of secalonic acid isolated from *P. hypomith* and *P. sphaerospora* is under study by D-NMR.

From *Usnea sp.* were isolated usnic acid and the depside difracteic acid.
From *Usnea aff. meridionalis* were isolated usnic, protocetraria, stictic and constictic acids. Besides these compounds, hypostictic, criptostictic and salazinic acids are also present in trace amount. The identification of the last 3 compounds was made by comparative chromatographic analysis with standard compounds and chromatographic analysis with standard compounds and the extracts with known composition and literature data (Culberson 1972, Culberson et al. 1981, white et al. 1985).

In *Heterodermia microphylle* were identified atranorine and zeorin. These 2 compounds are constant components of this genus. In other species, besides these 2 compounds, there are others, the common ones being depsides of the β-orcinol series, norstictic and salazinic acids.

Analysis performed in the present work, it was observed that in many cases, occur differences in the composition of lichenic acids when compared with literature data of sample

from different regions. These discrepancies can be attribute to age of the lichen, climate differences and other ambiental factors as it was mentioned before.

Besides these consideration, information concerning secondary metabolites found in literature is, in majority, results of the color reaction in lichen thallus which is used as an auxiliary tool for taxonomic studies. However, it is known that many species had the taxonomic identification revised due to information obtained from chemical analysis of isolated components and its structural elucidation.

Several simple bioassay methods have been developed for the evaluation of biological activity of plant extracts and pure substances. The evaluation of fungicidal activity using the bioautographic assay is a very simple method and fast and requires a minimum quantily of simple. Another assay is the toxicity check of plant extracts and pure substances using larvae of microcrustaceos *Artemia salina*.

A positive correlation exists between the toxicity to larvae of *Artemia salina* and *cytotoxicity* to Kb cell (Mclaughin 1991).

The results of the evaluation of fungicidal activity are promising, specially the ethyl orsenilate which after more rigorous test with other pathogenic organisms it can be a potential drug for diseases caused by fungi. Due to its simple structure, whwn compared to other compounds with similar activity, it can be prepared in laboratory when time comes for its commercial value.

The search for new fungicidal agents has received a special attention in the last 10 years. In agriculture there is a need for new fungicidal drugs which are more efficient than synthetic ones, economically viable and not a pollutant. In medical area there is a need for drugs which are efficient as antimycotic agents for the treatment of systemic mycosis.and new topical antiseptic for skin infection, badly needed in third world countries. The incident of mycosis has increased in last years dwe to the use of immunosuppressors (as in the case of diabetes and in persons with HIV positives) (Paxton 1991).

(+) usnic acid isolated from *U. meridionalis* had LD_{50} 3.70 ppm in toxicity bioassay using *A. salina*. Other compounds presented LD_{50}>50 ppm. The major difficutty in performing this test was the low solubility (in water) of lichenic compounds. Among compounds tested, only ethyl orselinate was completely soluble under experimental conditions. Dongning et al. (1994) tested the anti-tumor activity of 19 samples of chloroform extraction, pure compounds and polysaccharides of 6 different species of lichens in larvae of *A. salina*. Chloroform extracts of *Usnea longissima* and *Cladonia stellaris*, R(+) usnic acid, S(-) usnic acid and *Umbilicaria hypococcinea II* showed bioactivity. Among sample tested, the most active compound was S(-) sodium usnate which had LD_{50} 5.5 mg/ml.

Isolated lichenic compounds can be evaluated for other biological/pharmacological activities depending on the interest of the researcher.

Chemical Composition of 10 lichen species collected in Mato Grosso do Sul

Lichen	Compounds Isolated	Compounds Identifide (not isolated)
P. tinctorum	atranorine, 1 ecanoric acid ethyl orselinate *	chloroatranorine
P. dilatatum	atranorine Protocetraric acid	usnic acid
P. cf. delicatulum	usnic acid salazinic acid	
P. cf. miranda	usnic acid salazinic ac acid	
P. cf. flavescens	usnic acid salazinic acid	
P. sphaerospora	secalonic acid hypostictic	
P. hypomilta	secalonic	
Usnea sp.	usnic acid difractaic acid	
Usnea aff. meridionalis	usnic acid stictic acid protocetraric acid constictic acid	salazinic acid hipostictic acid criptostictic acid
H. micropphylla	atranorine	zeorin

*artifact

REFERENCES:

ABERHART D.J. & OVERTON, K.H. (1969) Studies on Lichen Substances. Part LXII. Aromatic constituents of the lichen *Roccella fuciformis* DC. A revised structure of Lepraric Acid. J. Chem. Soc. (C) 704-707.

AHMADJIAN, V. (1993) The Lichen Simbiosis, New York, John Wiley & Sons, apud Nash III, T.H. (1996) "Lichen Biology" 1 st. ed. Cambridge, Cambridge University Press.

AHMANN, G.B. and MATHEY, A, 1967. Lecanoric acid and some constituents of *Parmelia tinctorum* and *Pseudoevernia intensa.* Bryologist. 70(1): 93-97.

ANDERSEN, R, BÜCHI, G., KOBBE, B., and DEMAIN, A., L. 1997. Secalonic Acids D and F are Toxic Metabolites of -*Aspergillus aculeatus* J. Org. Chem., 42(2): 352-353.

BUDAVARI, S. 1989. The Merck Index, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, p. 8374.

BURKHOLDER, P.R., EVANS, A.W., McVEIGHI, I. & THORTON H.K. (1944) Antibiotic Activity of Lichens. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 30(9): 250-255.

BURKHOLDER, P.R., & EVANS, A.W. (1945) Further studies on the antibiotic activity of Lichen. Bull. Torrey Bot. Club. 72(2): 157-164.

BUSTINZA, F. 1951. Substances antibióticas procedentes de liquenes - Endeavour 10(38): 95-99.

CAIN, B.F. (1961) Potential Anti-tumour Agents. Part I. Polyporic Acid Series. J. Chem. Soc. 936-940.

CAIN, B.F. (1963) Potential Anti-tumour Agents Part II Polyporic Acid Series. J. Chem. Soc. 356-359.

CAIN, B.F. (1964) Potential Anti-tumour Agents Part III Polyporic Acid Series. J. Chem. Soc. 5472-5473.

CAIN, B.F. (1966) Potential Anti-tumour Agents Part IV. Polyporic Acid Series J. Chem. Soc. 1041-1045.

CULBERSON, C.F. and KRISTINSSON, H. 1970. A standardized nethod for the identification of lichen products. J. Chromatogr. 46: 85-93.

CULBERSON, C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standarzied thin-layer chromatographic method. J. Chromatogr., 72: 113-125.

CULBERSON, C.F., CULBERSON, W.L., and JOHNSON, A. 1977. Thermally induced chemical artifacts in lichens. Phytochemistry 16: 127-130.

CULBERSON, C.F., CULBERSON, W.L., & JOHNSON A. 1981. A Standardized TLC Analysis of β orcinol depsidones, The Brylogist 84 (1): 16-29.

CULBERSON, C.F., & ELIX, J.A. (1989) Lichen Substances, In Methads in Plant Biochemistry, vol.1 ed. P.M. Dly & Harbourne, pp. 509-35 London. Academic Press.

DONGNING, D., JUQING J., BAOQI Y. & CIBO, L. (1994). Brine shrimp lethality bioassay of six lichens constituents. Zhongguo Yaoxue Zazhi 29(4): 211-213 apud Chem. Abstr. , Columbus 121: 221173c, 1994.

ELIX, J. A. (1966) Biochemistry and secondary metabolites. In: "Lichen Biology", Nash III, T.H. (ed.) 1ª ed. Cambridge, Cambridge University Press.

FLEIG, M. & RIQUELME, I. (1991). Líquens de Piraputanga, Mato Grosso do Sul, Brasil. Acta. bot. bras. 5(1): 3-12.

FIGUEIREDO, M.B., e PIMENTEL, C.P.V. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungus na micoteca da Seção de Micolologia do Instituto Biológico. Summa Phytopathologica 1(4): 299-302.

FINNEY, d.j. (1971). Probit Analysis. 3rs. Cambridge Universty Press, Cambrigde.

GALLOWAY, D.J. 1985. Flora of New Zealand Lichens, Halleeberg, New Zealand.
CRIES, C. (1996) Lichens as indicators of air pollution. In "The Lichens" Nash III, T.H. (ed) 1ª ed. Cambrigde, Cambridge University Press.
HALE, JR. M.E., 1965. A monograph of *Parmelia* subgenus *Amphigymnia.* Contr. U.S. Nat. Herb., 36(5): 193-308.
HALE, JR. M. E. 1974. The Biology of Lichens. 2nd. ed. London, Edward Arnold, 181 pp.
HALE Jr. M. E. 1976. A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia* Lynge (*Parmeliaceae*). Smith. Contr. Bot., 31: 1-62.
HALE, Jr. M.E. 1983. The Biology of Lichens. 3rd. ed. Baltimore, Edward Arnold, 190 pp.
HALE, Jr. M.E. 1986. Flavoparmelia, a new genus in the lichen family *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*) Mycotaxon XXV(2): 603-605.
HIDALGO, M.E., FERNANDEZ, E, QUILHOT, W., and LISSI, E. 1994. Antioxidant activity of Depsides and Depsidones. Phytochemistry 6(37): 1585-1587.
HIRAYAMA, T., FUJIKAWA, F., KASAHARA, T., OTSUKA, M., NISHIDA, N., and MIZUNO, D. 1980. Anti-tumour Activities of Some Products and Their Degradation Products. Yakugaku Zasshi 100(7): 755-759.
HOMANS, A. L., and FUCHS, A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. J. Chromatog. 51: 327-329.
HUNECK, S. 1968. Lichen Substances. In: Reinhold L. & Liwschitz, Y. (Hrgs.) Progress in Phytochemistry 1: 223-346, London.
HYLANDS, P. J. and INGOLFSDOTTIR, K. 1985. The isolation of methyl β-orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon* species. Phytochemistry 24(1): 127-129.
INGOLFSDOTTIR, K., HYLANDS, P.J., and SOLBERG, Y. 1986. Structure of vesuvianic acid from *Stereocaulon* species. Phytochemistry 25(2): 550-553.
KALB K. (1987). Brasilianische Flechten 1. Die Gattung Pyxine. Bibliotheca Lichenologica, band 24. J. Cramer, Stuttgart.
KEOGH, M.F., 1977. Malonprotocetratic acid from *Parmotrema conformatum.* Phytochemistry 16:1102.
KUPCHAN, S.M. and KOPPERMAN, H.L. 1975.1-usnic acid: Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. Experientia 31(6): 625.
KUROKAWA, S. 1962. A monograph of the genus Anaptychia. Beihefte zur Nova Hedwigia. Helf 6. Verlag von J. Cramer, Weinheim. p. 449-558.
LIMA, R.M.O.C., NASCIMENTO, S.C., PEREIRA, E.C., HONDA, N.K., DEVINCENZI, I.A.A., ALVES, R.C. (1996). Estudo preliminar da ação antineoplástica de substâncias liquênicas. Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, pg. 131.
MacLAUGHLIN, J.L. (1991). Methods in Plant Biochemistry. In: Dey, P.M. & Harbone, J. eds. Academic Press, London, New York, vol.6 pp. 1-32.
MALME, G.O.A. (1902). Die flechten der ersten Regnellschen Expedition. II. Die Gattung *Rinodina* (Ach) Stiz Bih. T.K. SW. Vet.-Akad, Stockholm, 28(3): 1-53.
MALME, G.O.A. (1924). Die Flechten der ersten Regnellschen Expeditiopn. *Astrotheliaceae, Paratheliaceae* and *Trypetheliaceae.* Ark. Bot., Upsala, 19(1): 1-34.
MALME, G.O.A. (1925). Die *Pannariazeen* des Regnellschen Herbars. Ark. Bot., Upsala, 22ª (3): 1-11.
MALME, G.O.A. (1926). Lichenes basteniospori Herbarii Regnelliani Ark. Bot., 20A(9): 1-51.
MALME, G.O.A. (1927). *Buelliae* itineris Regnelliani primi. Ark. Bot., Upsala, 21A(14): 1-42.

MALME, G.O.A. (1934). Die Ramalinen der ersten Regnellschen Expedition. Ark. Bot., Upsala, 26A(12): 1-9,2Taf.

MALME, G.O.A. (1936). Pertusariae Exeditions Regnellianae primae. Ark. Bot., Upsala, 28A(9): 1-27.

MEYER, B.N. et al. (1982) Plant Med. 45, 31-34.

MOSBACH, K. (1969) Biosynthesis of lichen substances. Angewandle te chemie, Int. Edition 8: 240-50.

MURTY, T.K. (1960). J. Sci. Ind. Res. (India) 19B, 508 apud Hylands, P.J. & Ingolfsdottir, K. (1985) Phytochemistry 24(1): 127-129.

NASH III, T.H. (1996). Lichen Biology - introduction. In: "Lichen Biology" Nash III, T.H. (ed) 1ª ed. Cambridge, Cambridge University Press.

OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., KINOSHITA, Y., YAMAMOTO, Y. 1995. Usnic and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyrect components of *Usnea diffracta.* Planta Med. 61: 113-115.

PAXTON, J.D. (1991). Assays for antifungal activity. In: "Methods in Plant Biochemistry: Dey P.M. & Harbone, J. ed. vol. 6 pp. 32-46.

POUCHERT, C.J. & BEHNKE, J. (1993). The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FTNMR Spectra V.II. pp. 1258, 1ª ed. Aldrich Company, Milwankee Wisconsin.

SAKURAL, A. & GOTO, Y., 1987. Chemical studies on the lichen. I. The structure of Isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from *Parmelia tinctorum* Despr. Bull. Chem. Soc. Jpn. 60: 1917-1918.

SOLIS, P.N., WRIGHT, G.W., ANDERSON, M.M. GUOTA, M.P. & PHILLIPSON D.J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Med.59: 250-252.

SUDHOLM, E.G. & HUNECK S. (1981). ^{13}C NMR - Spectra of Lichen Depsides, Depsidones and Depsones. Chemica Scripta 18: 233-236.

SWINSCOW, T.D.V. and KROG, H. 1988. Macrolichens of East Africa, British Museum, London 389p.

TAKAI, M., UEHARA, Y and BEISLER, J.A. 1979: Usnic acid derivatives as potential antineoplasic agents. J. Med. Chem. 22: 1380-1384.

TAYLOR, C.J., 1967a. The Lichen of Ohio. Part I. Foliose Lichens Columbus, Ohio the Ohio State University, 151 pp.

TAYLOR,C.J., 1967b. The Lichen of Ohio. Part II. Fruticose and Cladoniform lichens. Columbus, Ohio. The Ohio State University, 95 pp.

THOMPSON, J.W., 1968. The lichen genus Cladonia in North America. Toronto, University Toronto Press, 172 pp.

TURNER, W.B. & Aldridge. D.C. (1983) Fungal Metabolites II. London. Academia Press

VICENTE, C. LEGAZ, M.E., PAULO, M.Q., & XAVIER FILHO, L. 1984. Chemical differences between two ecotypes of *Parmelia tinctorum.* Phyton, 44(2): 121-124.

WHITE, F.J. & JAMES, P.W., 1985. A new guide to microchemical techiques for the identification of lichen substances. Brit. Lichen. Soc. Bull., 57(Suppl) 53pp.

YOSIOKA, I., NAKANISHI, T., IZUMI, S. & KITAGAWA, I., 1968. Structure of lichen pigment entothein and its identity with secalonic acid A, a major ergot pigment. Chem. Pharm. Bull. (Tokio), 16: 2090-2091.

YOSIOKA, I., YAMAUCHI, H., MURATA, K., & KITAGAWA, I., 1972. Coloring substances of a lichen *Cetraria ornata.* Chem. Pharm. Bull. 20(5): 1082-1084.

NOTA: Este trabalho foi executado inteiramente por N.K. Honda.

第5章　社外成果発表状況

①特許出願（１件）

- リグニンの生分解方法及びリグニン処理材
  出願番号：特願平10－61530
  出願日：平成10年３月12日

本報告書の内容を公表する際は、あらかじめ新エネルギー・産業技術総合開発機構応用技術開発室の許可を受けて下さい。

電話：03－3987－9398