

射出胞子形成酵母の系統分類

高島昌子

射出胞子形成酵母の系統分類  
Systematic studies of ballistoconidium-forming yeasts

高島 昌子

1998年7月

## 目次

第一章 緒論	1
第一節 射出胞子形成酵母の系統分類学の歴史と現状	1
第二節 本研究の目的	13
第二章 18S rDNA および ITS 領域の塩基配列に基づく射出胞子形成酵母の系統関係	15
第一節 緒言	15
第二節 18S rDNA 塩基配列に基づく射出胞子形成酵母の系統関係	16
1. 材料および方法	16
1.1. 供試菌株	16
1.2. 塩基配列の決定方法	16
1.3. 系統解析	19
2. 結果と考察	19
2.1. <i>Bensingtonia</i> 属の系統関係	19
2.2. <i>Tilletiopsis</i> 属の系統関係	21
2.3. 射出胞子形成酵母の系統的全体像	23
第三節 射出胞子形成酵母に存在する group I intron	26
1. 材料および方法	26
1.1. Group I intron の挿入位置と推定二次構造	27
1.2. 保存領域に基づく系統解析	27
2. 結果と考察	27
2.1. Group I intron の挿入位置と挿入イントロンの構造的特徴	27
2.2. Group I intron の保存領域の塩基配列に基づく系統解析	36
第四節 <i>Sporobolomyces</i> 属の ITS 領域と 18S rDNA の塩基配列に基づく遺伝距離の比較	40
1. 材料および方法	41
1.1. 供試菌株	41
1.2. 塩基配列の決定方法と遺伝距離の比較	41
2. 結果と考察	42
第三章 担子菌系酵母の細胞壁糖組成とその系統分類学的意義	48
第一節 緒言	48
第二節 18S rDNA 塩基配列に基づく担子菌系酵母の系統と細胞壁糖組成	49
1. 材料および方法	49

1.1. 供試菌株	50
1.2. 細胞壁の調製法	50
1.3. 細胞壁の加水分解	50
1.4. 細胞壁中性糖の分析	50
1.5. 18S rDNA の塩基配列に基づく系統解析	53
2. 結果と考察	53
2.1. 細胞壁糖組成の分類指標としての安定性	53
2.2. サビキン綱およびクロボキン綱菌種の細胞壁糖組成 — <i>Sporidiobolus-Sporobolomyces</i> 属と <i>Tilletiopsis</i> 属の 細胞壁糖組成による区別 —	55
2.3. サビキン綱におけるフコースの分類学的意義	58
2.4. 細胞壁糖組成の分類学および系統学的意義	62
第四章 タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の同定と分布	65
第一節 緒言	65
第二節 射出胞子形成酵母の同定	65
1. 材料および方法	66
1.1. 供試菌株	66
1.2. 形態学および生理生化学的性状	66
1.3. 化学分類学的手法	66
1.3.1. 主要ユピキノンの同定	66
1.3.2. 菌体中のキシロースの有無	69
1.3.3. G+C 含量	69
1.3.4. DNA-DNA 交雑実験	73
1.4. 分子系統学的手法	73
2. 結果と考察	74
2.1. <i>Bensingtonia</i> 属	75
2.2. <i>Bullera</i> 属	81
2.3. <i>Kockovaella</i> 属	88
2.4. <i>Sporidiobolus-Sporobolomyces</i> 属	95
2.5. <i>Tilletiopsis</i> 属	116
第三節 射出胞子形成酵母の分布と種多様性	125
1. タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の分布 — 日本産およびニュージーランド産との比較 —	125
第五章 総合考察	135
1. 分子系統学のアプローチの分類学への適用	135

2. グルーピング手段としての 18S rDNA および ITS と その系統分類学的意義	136
3. 細胞壁糖組成に基づくグルーピングと系統分類学的意義	137
4. タイ産射出胞子形成酵母の分布と日本およびニュージー ランドとの比較	138
謝辞	140
引用文献	141
Appendix	154
付録 論文の内容の要旨	i

## 第一章 緒論

### 第一節 射出胞子形成酵母の分類の歴史と現状

射出胞子形成酵母は、射出胞子という独特の分生子を形成する一群の酵母に与えられた呼称である。主に、植物の葉や茎からの分離例が多く、その他、空気、土壌等の環境からも分離されており、また、少数ではあるが臨床材料からの分離例も報告されている。

射出胞子を形成する酵母の最初の報告は、von Wettstein (1885)による *Rhodomycetes kochii*、また Fischer と Brebeck (1894)による *Blastoderma salmonicolor* である。後に、Kluyver と van Niel (1924)は、接種した平板培地を裏返しておく、ふたに、鏡像(mirror-picture-formation, Spiegelbilderzeugung)のように胞子が落下することが際だった特徴であるとして *Sporobolomyces* 属を設立した。これに伴い、*Blastoderma salmonicolor* は、*Sporobolomyces* 属に移された。*Rhodomycetes kochii* はこの時点で既に培養株が存在せず、実体は明らかではない。1930年、Derx (1930)は新たに *Sporobolomyces* 属の数種を記載すると同時に、コロニーの色調と射出胞子の形態に基づいて、*Sporobolomyces* 属を *Sporobolomyces* 属と *Bullera* 属に分割した。また同時に、*Sporobolomycetaceae* 科を設立して、この2属を含めた。「射出胞子、ballistospore」という言葉を最初に用いたのも Derx (1948)で、彼は M. A. Donk の提唱に従って、“drop-excretion mechanism”によって射出される担子菌類の胞子を意味してこの言葉を用いたと記述している。

射出胞子形成酵母は、その独特の分生子形成様式から、かつてはある特定の分類群であると考えられていた。そして、担子菌系酵母の存在が知られていなかった当時、胞子の射出機構が担子菌類の担子胞子のそれと類似しているところから、担子菌類と近縁ではないかと推定されていた。そのため、生理学的にも細胞学的にも詳細に研究され、また、担子菌類との関連についての議論も行われた (Kluyver and van Niel, 1924, 1927; Lohwag, 1925)。Buller (1933)は胞子の射出機構について詳細な観察を行い、いわゆる“drop-excretion mechanism”によって胞子を射出していることから、*Sporobolomyces* 属は担子菌類であると報告している。そして、1949年、Nyland (1949)による有性時代を有する *Sporidiobolus johnsonii* の発見により、*Sporobolomycetaceae* 科は担子菌類として認められるようになった。

酵母の分類学における標準の書とされている“The yeasts, a taxonomic study” (以下、“The yeasts”)では、1952年発行の第1版から射出胞子形成酵母が掲載されており、また射出胞子形成能の試験についても詳細に記述されている。“The yeasts”, 第1版では、酵母は子嚢胞子を作る *Saccharomyces* 属などの *Endomycetaceae* 科 (the ascosporegenous yeasts)、射出胞子を作る

*Sporobolomycetaceae* 科、および子嚢胞子も射出胞子も作らない *Cryptococcaceae* 科 (the asporogenous yeasts) の 3 つに分類されていた。すなわち、射出胞子形成能をもつ酵母は当時、一つの分類群を成すと考えられていた (Table 1.1)。Derx (1948) は、当初、*Bullera* 属と *Sporobolomyces* 属が含まれていた *Sporobolomycetaceae* 科に、射出胞子形成能をもつ yeast-like fungi の *Tilletiopsis* 属と *Itersonilia* 属も含めた。しかし、この 2 つの属は、菌糸体としてすることから酵母として受け入れられず、“The yeasts”には、第 3 版までのいずれの版にもこの両属は含まれていない。

Table 1.1. Classification of the yeasts in “The yeasts, a taxonomic study”, 1st ed. (1952)

	Family	Subfamily	Tribe	Genus (No. of genera)	
The ascosporogenous yeasts	<i>Endomycetaceae</i>	<i>Eremascoideae</i>		<i>Eremascus</i>	
		<i>Endomycetoideae</i>		<i>Schizosaccharomyces</i> etc. (2)	
		<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Endomycopseae</i>		<i>Endomycopsis</i>
			<i>Saccharomyceteae</i>		<i>Saccharomyces</i> etc. (5)
			<i>Nadsoneae</i>		<i>Saccharomyces</i> etc. (3)
			<i>Nematosporideae</i>		<i>Monosporalla</i> etc. (3)
			<i>Lipomycetoideae</i>		<i>Lipomyces</i>
		The yeasts forming ballistospores	<i>Sporobolomycetaceae</i>		
				<i>Bullera</i>	
				<i>Tilletiopsis</i>	
				<i>Itersonilia</i>	
				<i>Cryptococcus</i> etc. (7)	
The asporogenous yeasts	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Cryptococcoideae</i>		<i>Cryptococcus</i> etc. (7)	
		<i>Trichosporideae</i>		<i>Trichosporon</i>	
		<i>Rhodotoruloideae</i>		<i>Rhodotorula</i>	

上述のように、Nyland による *Sporidiobolus johnsonii* の報告によって射出胞子形成酵母 *Sporobolomycetaceae* 科は担子菌類であることが認められた。Banno (1967) は、*Cryptococcaceae* 科 (the asporogenous yeasts) に属する *Rhodotorula* 属の中から有性時代を持つ新属 *Rhodosporidium* 属を発見した。次いで Fell ら (1969) も、同じく *Cryptococcaceae* 科の *Candida* 属から有性時代をもつ *Leucosporidium* 属を創設した。これらの発見は、“The yeasts”, 第 1 版の 3 つの分類群に加えて、担子菌系酵母という分類群を確立した。“The yeasts”, 第 2 版においては、第 1 版に従って、射出胞子形成酵母は担子菌系酵母の中で *Sporobolomycetaceae* 科として独立の分類群とされてはいるものの、*Rhodosporidium* 属および *Leucosporidium* 属と関連が深いのではないかと指摘されている (Table 1.2)。そして“*The yeasts*”, 第 3 版においては、射出胞子形成能をもつ酵母は独立の分類群とはされず、*Sporidiobolus* 属は *Rhodosporidium* 属および *Leucosporidium* 属と共に担子菌系酵母の中の冬胞子 (teliospore) を形成することを特徴とするテレオモルフ (teleomorph) の “teliospore-forming yeasts” として統合された。また *Sporobolomyces* 属などアナモルフ (anamorph) の射出胞子形成酵母は、*Sporobolomycetaceae* 科として不完全酵母に含まれている (Table 1.3)。

Table 1.2. Classification of the yeasts in "The yeasts, a taxonomic study", 2nd ed. (1970)

	Order	Family	Subfamily	Genus (No. of genera)
The ascomycetous yeasts	Endomycetales	<i>Dipodascaceae</i>		<i>Dipodascus</i>
		<i>Endomycetaceae</i>		<i>Eremascus</i> etc (3)
		<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Schizosaccharomycoidaeae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
			<i>Nadsonioideae</i>	<i>Nadsonia</i> etc (4)
			<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Saccharomyces</i> etc. (13)
			<i>Lipomycetoideae</i>	<i>Lipomyces</i>
	<i>Spermophthoraceae</i>		<i>Spermophthora</i> (7)	
Basidiomycetes	Ustilaginales	?		<i>Rhodosporidium</i> <i>Leucosporidium</i>
Basidiomycetes	?	<i>Sporobolomycetaceae</i>		<i>Sporobolomyces</i>
				<i>Bullea</i>
				<i>Sporidiobolus</i>
				<i>Tilletopsis</i>
				<i>Itersonilia</i>
Deuteromycetes	?	<i>Cryptococcaceae</i>		<i>Cryptococcus</i> etc. (12)

Table 1.3. Classification of the yeasts in "The yeasts, a taxonomic study", 3rd ed. (1984)

	Class	Order	Family	Subfamily	Genus (No. of genera)
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Spermophthoraceae</i>		<i>Coccidiascus</i> etc. (3)
			<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Schizosaccharomycoidaeae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
				<i>Nadsonioideae</i>	<i>Nadsonia</i> etc. (4)
				<i>Lipomycetoideae</i>	<i>Lipomyces</i>
				<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Saccharomyces</i> etc. (24)
Basidiomycotina	?	?	<i>Filobasidiaceae</i>		<i>Chinosphaera</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i>
		Ustilaginales	"Teliospore-forming yeasts"		<i>Rhodosporidium</i> <i>Leucosporidium</i> <i>Sporidiobolus</i>
		Tremeliales	<i>Sirobasidiaceae</i>		<i>Filobasidium</i> <i>Sirobasidium</i> <i>Holtermannia</i>
			<i>Tremellaceae</i>		<i>Tremella</i>
Deuteromycotina	Blastomycetes	?	<i>Cryptococcaceae</i>		<i>Cryptococcus</i> etc (15)
		?	<i>Sporobolomycetaceae</i>		<i>Sporobolomyces</i> <i>Bullea</i> <i>Tilletopsis</i> <i>Itersonilia</i>

近年、分子生物学の発達に伴い、リボゾーム遺伝子などの塩基配列をもとに生物の系統学的な解析が行われるようになった。担子菌系酵母においても、当初は粗精製した rRNA を逆転写酵素を用いて直接シーケンスする方法が用いられた。最近では Polymerase Chain Reaction (PCR) の出現により、以前より塩基配列の決定が比較的容易となり、ほぼ完全な small subunit rRNA 遺伝子 (以下 18S rDNA) 配列が生物全般にわたって多く報告されるようになった。その結果、生物界における菌類の位置についてもほぼ全体像を描くことが可能になりつつある (Fig. 1.1.1 および Fig. 1.1.2)。これによると、菌類は、藻類や植物よりもむしろ



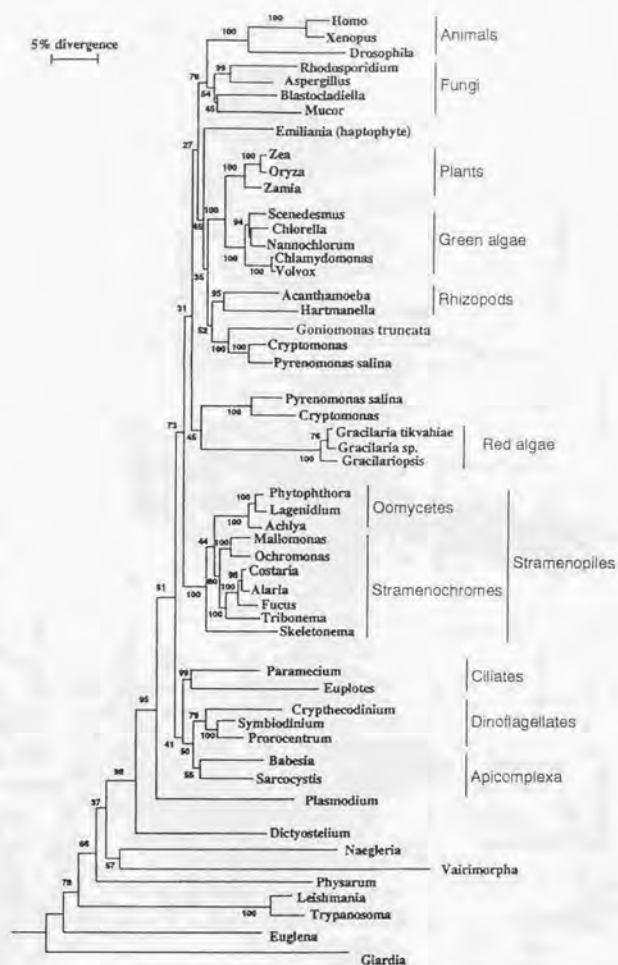


Fig. 1.1.1. Phylogenetic tree of eukaryotes based on 18S rDNA sequences.

(McFadden et al. 1994, modified.)

The authors constructed the tree from the evolutionary distance data according to Jukes and Cantor (1969) based on 1,788 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985).

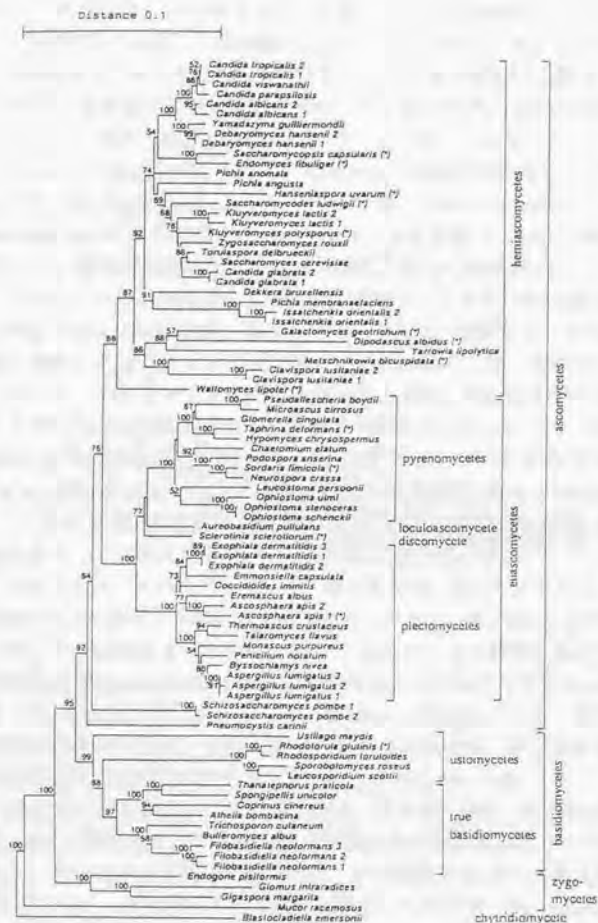


Fig. 1.1.2. Phylogenetic tree of higher fungi based on 18S rDNA sequences.

(Wilmette et al., 1993)

The authors constructed the tree from the evolutionary distance data according to Jukes and Cantor (1969) using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985).

ろ動物と近縁であり、菌類のクラスターはいわゆる高等菌類と下等菌類に分れる。さらに、高等菌類は単系統であり、子囊菌類と担子菌類に分かれている。そして、子囊菌類では真正子囊菌類(euascmycetes)と酵母形をとる半子囊菌類(hemiascomycetes)は、それぞれ単系統である。一方、担子菌類では酵母形をとるものが必ずしも単系統ではなく、系統樹の中では酵母時代のない担子菌類、またキノコなども混在しながら位置していることが明らかとなった。

Swann と Taylor (1993, 1995) は 18S rDNA の塩基配列に基づき、担子菌類を、クロボキン綱 (Ustilaginomycetes)、サビキン綱 (Urediniomycetes) および菌叢綱 (Hymenomycetes) の 3 つの綱 (class) に分けることを提唱し、併せて綱の定義の修正を行った。細胞壁糖組成および菌糸隔壁孔の形など微細構造のデータもこの分類を支持している。彼らは、それまでに提唱されてきた、Patouillard (1900)、Lowy (1968)、Talbot (1965, 1968)、Donk (1972) らの高次分類群に従った系統樹と、彼らの最大節約法による系統樹を最尤法によって比較し、担子菌類をこれら 3 つの綱に分けることは妥当であると述べている。当初、独自の分類群をなすと考えられてきた射出胞子形成酵母は、系統学的解析により、この 3 つの綱のすべてに他の担子菌類と混在しており、単系統ではないことがわかってきた (Nakase et al., 1993; Suh and Nakase, 1995; Suh et al., 1996a, 1996c; Takashima et al. 1995a)。いいかえれば、射出胞子形成能をもつ酵母は、分子系統学的には、担子菌類全体にわたって分布していることが明らかとなった。

1998 年に発行された "The yeasts", 第 4 版では、これら分子系統学的なデータを基に、従来の酵母の分類体系に修正が加えられた (Boekhout, et al. 1998)。その一つが、それ以前から "The yeasts" の中で扱われてきた酵母に加えて、生活環の一部に酵母形 (yeast state) をとるものも含まれていることである。射出胞子を形成する *Itersonilia* 属、*Tilleiaria* 属、*Tilletiopsis* 属についても、第 4 版では詳しい説明が行われている。また、高次分類群の説明には、酵母形をとるものが、高等菌類の中での位置づけとして記されている (Table 1.4)。

Table 1.5 は "The yeasts", 第 1 版 (1952)、第 2 版 (1970)、第 3 版 (1984) および第 4 版 (1998) に掲載されている射出胞子形成酵母の種を示したものである。これによると、射出胞子形成酵母の種数は、その発見から 100 年以上の長い歴史にもかかわらず、10 数年前までは比較的少ないものであった。1984 年の "The yeasts", 第 3 版においては、掲載された射出胞子形成酵母は *Sporidiobolus* 属 4 種、*Sporobolomyces* 属 7 種、*Bullera* 属 6 種である。このうち、完全時代と不完全時代の重複と、培養株が存在せず実体の不明な種を除けば、実質的には 14 種となる。また、シロキクラゲ目の *Sirobasidium* 属と *Fibulobasidium* 属の各 1 種が培養した酵母時代に射出胞子を形成することも報告されている。Nakase と Suzuki (1985) は、Derx (1930) が用いた射出胞子捕集法に対して、生長の速い糸状菌などの生育を抑制し、また、射出胞子が培地上に捕集される機会をできるだ

Table 1.4. Classification of basidiomycetous yeast groups in "The yeasts, a taxonomic study", 4rd ed. (1998)

Characteristics Teleomorphic taxa	Order	Family	Genus
I. With "simpler" septal pores			
A. Basidia cylindrical, transversely septate	Ustilaginales	Ustilaginaceae	<i>Microbotryum</i> , <i>Schizonella</i> , <i>Sorosporium</i> , <i>Sphaelotheca</i> , <i>Sporisorium</i> , <i>Ustilago</i> , <i>Ustilantioma</i>
	Sporidiales	Sporidiobolaceae	<i>Leucosporidium</i> , <i>Rhodosporeidium</i> , <i>Sporidiobolus</i>
	Platyglabales	Cystobasidiaceae	<i>Coliactogloea</i> , <i>Cystobasium</i> , <i>Kriegeria</i> , <i>Mycogloea</i> , <i>Occultifer</i> , <i>Tijlbodasia</i>
	Septobasidiales	Septobasidiaceae	<i>Auriculariocypha</i> , <i>Coccidioclycyon</i> , <i>Ordonia</i> , <i>Septobasidium</i>
	Atractiellales	Chinosphaeaceae	<i>Chinosphaera</i> , <i>Stilbum</i>
	Agaricostilbales	Atractoglobeaceae	<i>Atractogloea</i>
B. Basidia globose, nonseptate	Graphiolales	Agaricostilbaceae	<i>Agaricostilbum</i>
C. Basidia cylindrical, nonseptate	Cryptobasidiales	Graphiolaceae	<i>Graphiola</i>
	Exobasidiales	Cryptobasidiaceae	<i>Conyodyctum</i> , <i>Cryptobasidium</i>
		Microstromaceae	<i>Microstroma</i>
		Exobasidiaceae	<i>Brechybasidium</i> , <i>Dicellomyces</i> , <i>Exobasidiellum</i> , <i>Exobasidium</i> , <i>Laurabasidium</i>
II. With dolipore septa, parenthesesomes cupulate			
A. Basidia "cruciate-septate"	Tremellales	Sirobasidiaceae	<i>Fibulobasidium</i> , <i>Sirobasidium</i>
		Tremellaceae	<i>Bulleromyces</i> , <i>Itersonilia</i> , <i>Holtermannia</i> , <i>Phyllogloea</i> , <i>Sirotrema</i> , <i>Tremella</i> , <i>Trimorphomyces</i>
B. Basidia aseptate	Filobasidiales	Filobasidiaceae	<i>Cystofilobasidium</i> , <i>Filobasidiella</i> , <i>Filobasidium</i> , <i>Mrakia</i> , <i>Xanthophyllomyces</i>
		Syzygosporaceae	<i>Christiansenia</i> , <i>Syzygospora</i>
		Sporobolomyceaceae	<i>Bensingtonia</i> , <i>Kurtzmanomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Sterigmatomyces</i>
		Cryptococcaceae	<i>Bullera</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Fellomyces</i> , <i>Kockovaella</i> , <i>Phaffia</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Tsuchiyaea</i> , <i>Udeniomyces</i>
Anamorphic taxa			

Table 1.5. Ballistoconidium-forming yeasts included in "The Yeasts, a taxonomic study"

	No. of Species
<b>First edition (1952)</b>	
<i>Bullera</i> (Hanna) Derx	2
<i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx 1930	
<i>Bullera grandispora</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces</i> Kluwyver et van Niel	7
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluwyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluwyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces odorus</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces glaucis</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces albo-rubescens</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces pararoseus</i> Olsen et Hammer 1937	
<i>Sporobolomyces holsaticus</i> Windosch 1949	
<b>Second edition (1970)</b>	
<i>Bullera</i> (Hanna) Derx	3
<i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx 1930	
<i>Bullera grandispora</i> Derx 1930	
<i>Bullera tsugae</i> Phaff et do Carmo-Sousa 1962	
<i>Sporidiobolus</i> Nyland	2
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> Nyland 1949	
<i>Sporidiobolus ruinenii</i> Phaff 1970	
<i>Sporobolomyces</i> Kluwyver et van Niel	9
<i>Sporobolomyces albo-rubescens</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces glaucis</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces hispanicus</i> Pelaez et Ramirez 1956	
<i>Sporobolomyces holsaticus</i> Windisch 1949	
<i>Sporobolomyces odorus</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces pararoseus</i> Olsen et Hammer 1937	
<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluwyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluwyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces singularis</i> Phaff et do Caumo-Sousa 1962	
<b>Third edition (1984)</b>	
<i>Bullera</i> (Hanna) Derx	6
<i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx 1930	
<i>Bullera dendrophila</i> van der Walt et Scott 1970	
<i>Bullera grandispora</i> Derx 1930	
<i>Bullera piricola</i> Stadelmann 1975	
<i>Bullera singularis</i> (Phaff et do Carmo-Sousa) Rodrigues de Miranda 1984	
<i>Bullera tsugae</i> Phaff et do Carmo-Sousa 1962	
<i>Sporidiobolus</i> Nyland	4
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> Nyland 1949	
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> Fell et Talman 1981	
(Anamorph: <i>Sporobolomyces shibatanus</i> (Okunuki) Verona et Ciferri)	

(continued)

<i>Sporidiobolus ruinenii</i> Hölzschu, Tredick et Phaff 1981	
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> Fell et Tallman 1981	
(Anamorph: <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluyver et van Niel)	
<i>Sporobolomyces</i> Kluyver et van Niel	7
<i>Sporobolomyces albo-rubescens</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces glaucilis</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces holsticus</i> Windisch 1949	
<i>Sporobolomyces puniceus</i> (Komagata et Nakase) Ahearn et Yarrow 1972	
<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver et van Niel 1925	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces shibatanus</i> (Okunuki) Verona et Ciferri 1938	
<hr/>	
<i>Sirobasidium</i> Lagerh et Pat.	1
<i>Sirobasidium magnum</i> Boedijn 1934	
<i>Fibulobasidium</i> Bandoni	1
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i> Bandoni 1979	
<hr/>	
Fourth edition (1998)	
<hr/>	
<i>Bensingtonia</i> Ingold emend. Nakase et Boekhout	9
<i>Bensingtonia ciliata</i> Ingold 1986	
<i>Bensingtonia ingoldii</i> Nakase et Itoh 1989	
<i>Bensingtonia intermedia</i> (Nakase et Suzuki) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bensingtonia miscanthi</i> (Nakase et Suzuki) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bensingtonia naganoensis</i> (Nakase et Suzuki) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bensingtonia phyllidus</i> (van der Walt et Yamada) van der Walt, Nakagawa et Yamada 1988	
<i>Bensingtonia subrosea</i> (Nakase et Suzuki) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bensingtonia yamatoana</i> (Nakase, Suzuki et Itoh) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bensingtonia yuccicola</i> (Nakase et Suzuki) Nakase et Boekhout 1988	
<i>Bulleromyces</i> Boekhout et A. Fonseca	1
<i>Bulleromyces albus</i> Boekhout et A. Fonseca 1991	
(Anamorph: <i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx)	
<i>Bullera</i> Derx	13
<i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx 1930	
<i>Bullera armeniaca</i> Buhagiar 1983	
<i>Bullera crocea</i> Buhagiar 1983	
<i>Bullera dendrophila</i> van der Walt et Scott 1970	
<i>Bullera globispora</i> Johri et Bandoni 1984	
<i>Bullera megalospora</i> Nakase et Suzuki 1985	
<i>Bullera miyagiana</i> Nakase, Itoh, Takematsu et Bandoni 1990	
<i>Bullera oryzae</i> Nakase et Suzuki 1985	
<i>Bullera piricola</i> Stadelmann 1975	
<i>Bullera pseudoalba</i> Nakase et Suzuki 1986	
<i>Bullera punicea</i> (Komagata et Nakase) Nakase et Suzuki 1986	
<i>Bullera sinensis</i> Li 1982	
<i>Bullera variabilis</i> Nakase et Suzuki 1987	
<i>Itersonilia</i> Derx	1
<i>Itersonilia perplexans</i> Derx 1948	

(continued)

<i>Kockovaella</i> Nakase, Banno et Yamada	2
<i>Kockovaella imperatae</i> Nakase, Banno et Yamada 1991	
<i>Kockovaella thailandica</i> Nakase, Banno et Yamada 1991	
<i>Sporidiobolus</i> Nyland	4
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> Nyland 1949	
(Anamorph: <i>Sporobolomyces holzschii</i> Windisch)	
<i>Sporidiobolus paraseus</i> Fell et Tallman 1981	
(Anamorph: <i>Sporobolomyces shibatanus</i> (Okunuki) Verona et Ciferri)	
<i>Sporidiobolus ruinenii</i> Holzschu, Tredick et Phaff 1981	
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> Fell et Tallman 1981	
(Anamorph: <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluyver et van Niel)	
<i>Sporobolomyces</i> Kluyver et van Niel	21
<i>Sporobolomyces alborubescens</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces elongatus</i> Shivas et Rodrigues de Miranda 1983	
<i>Sporobolomyces falcatus</i> Nakase, Itoh et Suzuki 1987	
<i>Sporobolomyces follicola</i> Shivas et Rodrigues de Miranda 1983	
<i>Sporobolomyces gracilis</i> Derx 1930	
<i>Sporobolomyces griseoflavus</i> Nakase et Suzuki 1987	
<i>Sporobolomyces inositolophilus</i> Nakase et Suzuki 1987	
<i>Sporobolomyces kluyverinii</i> van der Walt 1986	
<i>Sporobolomyces lactophilus</i> Nakase, Itoh, Suzuki et Bandoni 1990	
<i>Sporobolomyces oryzicola</i> Nakase et Suzuki 1986	
<i>Sporobolomyces phyllomatis</i> van der Walt et Yamada 1988	
<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces ruber</i> (Nakase, Okada et Sugiyama) Boekhout 1991	
<i>Sporobolomyces salicinus</i> (Johri et Bandoni) Nakase et Itoh 1988	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer et Brebeck) Kluyver et van Niel 1924	
<i>Sporobolomyces sasicola</i> Nakase et Suzuki 1987	
<i>Sporobolomyces shibatanus</i> (Okunuki) Verona et Ciferri 1938	
<i>Sporobolomyces singularis</i> Phaff et do Carmo-Sousa 1962	
<i>Sporobolomyces subbrunneus</i> Nakase et Suzuki 1985	
<i>Sporobolomyces tsugae</i> (Phaff et do Carmo-Sousa) Nakase et Itoh 1988	
<i>Sporobolomyces xanthus</i> (Nakase, Okada et Sugiyama) Boekhout 1991	
<i>Tilletiaria</i> Bandoni et Johri	1
<i>Tilletiaria aromala</i> Bandoni et Johri 1972	
<i>Tilletiopsis</i> Derx ex Derx	6
<i>Tilletiopsis albescens</i> Gokhale 1972	
<i>Tilletiopsis flava</i> (Tubaki) Boekhout 1991	
<i>Tilletiopsis fulvescens</i> Gokhale 1972	
<i>Tilletiopsis minor</i> Nyland 1950	
<i>Tilletiopsis pallescens</i> Gokhale 1972	
<i>Tilletiopsis washintonensis</i> Nyland 1950	
<i>Sirobasidium</i> Lagerh et Pat.	1
<i>Sirobasidium magnum</i> Boedijn 1934	
<i>Fibulobasidium</i> Bandoni	1
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i> Bandoni 1979	

け多くすることを目的に、捕集は 17°C 程度の比較的低温で行い、また毎日培地を交換する等の改良を加えた。これにより、射出胞子形成酵母の分離数は増大し、国内および国外の研究者により、多くの新種が報告された。その後、現在までに射出胞子形成酵母としてテレオモルフの *Bulleromyces* 属 (Boekhout et al., 1991)、またアナモルフの *Bensingtonia* 属 (Ingold, 1986)、*Kockovaella* 属 (Nakase et al., 1991) および *Udeniomyces* 属 (Nakase and Takemastu, 1992) が新たに設立され、多くの種が記載された。“The yeasts”, 第 4 版においては、*Udeniomyces* 属は *Bullera* 属のシノニムとして扱われているが、射出胞子形成能をもつ “ballistoconidia-forming yeasts and yeastlike fungi” として計 12 属 60 種が収載されている。

上述したように、“The yeasts”, 第 4 版においては、18S rDNA などの塩基配列に基づく系統解析の結果を背景に、高次分類群にも修正が加えられたが、それはまだ系統関係をよく反映しているとは言いがたい。例えば、菌類の高次分類は担子器の形など形態的な特徴を基に行われたため、“The yeasts”, 第 4 版においても、高次分類はこれに従っており、系統関係を必ずしも反映しない部分も多い。また、テレオモルフとアナモルフは、系統的には区別することができないが、それぞれ別の高次分類群に含まれている。さらに、アナモルフでは、2 つの科 (*Sporobolomycetaceae* 科と *Cryptococcaceae* 科) が認められているが、クロボキン綱に対応するアナモルフの分類群が設立されていないため、*Malassezia* 属、*Pseudozyma* 属、*Symptodiomyces* 属、*Tilletiopsis* 属などは科以上の高次分類群が存在しない。

属の分類についてみると、担子菌系酵母は、主に担子器の形、冬胞子の有無、菌糸隔壁孔の微細構造、射出胞子の有無等の形態学的特徴、および菌体中のキシロースの有無、主要ユビキノン系など化学分類学的性質を指標として、分類が行われている (Table 1.6)。18S rDNA の塩基配列の解析からみると、このうち、担子器の形や冬胞子の有無、また射出胞子の有無等、形態学的特徴は、射出胞子形成酵母及び関連菌類の系統関係とは必ずしも一致していない部分があることがわかる。菌体中のキシロースの有無は、菌糸隔壁孔の構造と共に、系統関係と良く一致している。一方、主要ユビキノン系については、子囊菌系酵母では、系統関係とよい一致を示しているものの、担子菌系酵母では、未だ明らかではない (Suh and Sugiyama, 1993a, Takashima et al., 1995a)。これは属の分類指標として用いられてきた形態学および化学分類学的性質は、必ずしも系統関係を反映しているものではない、ということを示唆するものである。

このように、担子菌系酵母の高次分類群は混沌としているのが現実である。その原因として、第一に系統関係に関する情報の不足が挙げられる。“The yeasts”, 第 4 版掲載の酵母の内、18S rDNA 塩基配列のデータなどがデータベースから利用できるのはごくわずかの種である。第二に、現在の分類体系は、既



Table 1.6. Salient characteristics among ballistoconidium-forming yeasts and related genera

Class	Teleomorph	Basidial form <sup>v</sup>	Teliospore <sup>v</sup>	Septal pore structure <sup>v</sup>	Ballistoconidium <sup>v</sup>	Stalked conidium <sup>v</sup>	Budding cell <sup>v</sup>	Xylose in the cells <sup>a</sup>	Major ubiquinone <sup>b</sup>	Anamorph
Ustilaginomycetes	?				-	+	+		Q9	<i>Malassezia</i>
	<i>Tilletaria</i>	phragmo	+	primitive dolipore	+	-/+	-/+	-	Q10	?
	<i>Erythronia</i> ?				-		+			<i>Tilletopsis</i>
	?									<i>Sympodiomyces</i> <i>Pseudozyma</i>
Urediniomycetes	?				-	+	-		Q9	<i>Sterigmatomyces</i> <i>Bensingtonia</i>
	?				+	-/+	+			
	<i>Kondoa</i>				-				Q9/Q10	<i>Rhodotorula</i>
	<i>Leucosporidium</i>	phragmo	+	simple pore	-		+		Q10	<i>Kurtzmanomyces</i>
	<i>Rhodospordium</i>				-				Q10 (H <sub>1</sub> )	<i>Sporobolomyces</i>
	?				-		+/+		Q10 (H <sub>1</sub> )	?
	<i>Sporidobolus</i>	holo/phragmo	+	simple pore	+	-/+	+/+			
<i>Erythrobasidium</i>	holo	-		-		+				
Hymenomycetes	<i>Cystoflobasidium</i>	holo	+		-				Q8	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Mrakia</i>				-				Q9	<i>Itersonilia</i>
	?				+				Q9/Q10	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Flobasidium</i>	holo	-	dolipore	-		+	+		<i>Trichosporon</i> <i>Bullera</i>
	?				-				Q10	<i>Phaffia</i> <i>Udeniomyces</i> <i>Keckovaella</i> <i>Cryptococcus</i>
Hymenomycetes	<i>Bulleromyces</i>	phragmo	-		+					
	<i>Xanthophyllomyces</i>				-					
	?				+					
?	<i>Filobasidiella</i>	holo	-	dolipore	-					
	<i>Sterigmatosporidium</i>				-	+	-			<i>Fellomyces</i>
					?					

<sup>v</sup>, Kurtzman and Fell (1998).

<sup>a</sup>, Boekhout (1991b), Johnson-Field and Moore (1972), Kwon-Chung and Popkin (1976), Moore (1972), Moore and Keger-van Rij (1972), Nakagiri and Tsukaki (1985), Coenwinker et al. (1985), Suh and Sugiyama (1985b), and Suh et al. (1993).

知の種の上に成り立ったものであるが、*Saccharomyces cerevisiae* を代表とする子囊菌酵母では、系統樹上では報告されている種間の遺伝距離が短いのに対して、担子菌系酵母では比較的長い部分が多く見られる。これは、現在報告されている担子菌系酵母は系統的に離れているものも多いことを示すものである。さらに多くの種を分離し、系統的に離れた種間の系統的類縁関係を明らかにしていくことによって、担子菌類のより正確な系統関係を明確にすることができると推定される。また、同時に比較的近縁な種同士に共通な形質を見出し、属あるいは科に対応する表現形質を探索することも可能であろうと推定される。

## 第二節 本研究の目的

Lodder が "The yeasts", 第 2 版の中で "The most perfect classification is a natural one, that is to say a classification based on phylogeny." と述べているように、理想の分類体系は系統関係に従ったものである。しかし、Lodder は同時に、系統関係を反映する情報が乏しいため、理想の分類の実現は非常に難しいものであるとも述べている。その事情は、分子生物学が進歩し系統学的な解析が比較的容易になった現在においても、必ずしも改善されたわけではないと思われる。

系統関係を反映する分類体系を構築するために、分類学者たちは、常に、1) 従来分類に系統関係を反映すると思われる新しい手法を取り入れ、2) 多くの分類群にこれをあてはめ、3) データを蓄積、そして 4) 分類指標としての位置を評価する、という過程を繰り返し、その時代において最も理想と思われる分類を行っている。その結果、現在の酵母の分類においては、生物学的「種」と DNA-DNA 交雑実験の相同値の対比から、「種」に対する指標はある程度明確になってきたと考えられる (Price et al., 1978)。一方、担子菌系酵母の高次分類に関しては、前述のように、指標とされてきた形態的および化学分類学的特徴は、必ずしも系統関係を反映していない部分もあることが明らかとなってきている。従来、特に属以上の体系の再構築を行なうため、分類指標として有効な新規表現形質の探索が急務である。また、現在の分類体系は、酵母の場合、"The yeasts" に掲載されている種の総数約 690 に基づくものであるが、これは自然界に存在する種の数のごく一部であると推定されている (Hawksworth, 1991)。従って、自然界などから新規分類群を分離し、より多くの種の表現形質を明らかにし、分類体系の再検討を行うことが必要である。そこで、系統関係に基づく分類体系を構築するために、新たな種を分離し、担子菌系酵母の新たな系統関係を探索すると共に、系統関係を反映する新規表現形質を探索することを目的に本研究を行った。

理化学研究所微生物系統保存施設における射出胞子形成酵母の研究は、1984 年、本酵母を自然界から精力的に分離することから始まった (Nakase and

Suzuki, 1985)。射出胞子形成酵母の分離は胞子を射出するという特徴を生かし、射出された胞子だけを選択的に培地上に捕集できるため、比較的容易に行うことが可能である。中瀬およびその共同研究者たちは、Nakase と Suzuki (1985) の改良射出胞子捕集法を用いて、日本各地、およびニュージーランドの植物の葉や茎から射出胞子形成酵母の分離を行い、多くの新種の記載を行った。

一方、研究手法として分子生物学的手法を採り入れ、多くの射出胞子形成酵母に適用してきた。これにより、射出胞子形成酵母は、担子菌系酵母であることが確認されたばかりではなく、担子菌類の 3 つの綱のすべてに位置することがわかってきた。また、分子系統学的には射出胞子形成酵母は射出胞子を形成しない酵母や他の関連菌群と入り交じって系統樹の上に位置しており、同一の属内においても必ずしも単系統ではないことも明らかとなってきた。これらをさらに系統関係と表現形質の両面から詳細に検討するためには、研究対象を射出胞子形成酵母のみに集中させるのではなく、担子菌類全体の中から、あるいはさらに他の菌類とも関連づけて研究を行うことが必要である。

本研究では、これまで理化学研究所における研究が、日本、ニュージーランド等、主に温帯地域の植物から分離した射出胞子形成酵母についてであったのに対し、熱帯地域の植物に棲息する射出胞子形成酵母に焦点を当てた。熱帯の植物は非常に多様で、それに棲息する射出胞子形成酵母も、温帯域のものとは異なった多様性を示すであろうと推定されるからである。第二章では射出胞子形成酵母の 18S rDNA に基づく系統関係について述べた。18S rDNA に存在した group I intron については、系統学的な解析を行い 18S rDNA の系統関係と比較を行った。また、系統的に近縁な種間の関係を論じるのに適しているといわれている ITS 領域の塩基配列も決定し、18S rDNA 塩基配列と比較して、ITS 領域の塩基配列が系統関係の推定に有効な範囲を求めた。第三章では、担子菌系酵母の系統関係を反映する新たな表現形質の探索の一つとして、細胞壁糖組成を取り上げた。さらに、第四章ではこれらのデータを基に、1987 年と 1990 年の 2 回にわたって採取した、熱帯であるタイの植物から分離した射出胞子形成酵母の系統分類について述べた。また、生物学的多様性の面から、日本およびニュージーランドの射出胞子形成酵母の分布の比較も行った。研究を行うに当たっては、いわゆる射出胞子形成酵母だけではなく、yeast-like fungi といわれてきた *Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria* 属、また射出胞子を形成しない種も加え、担子菌類全体としての系統分類学的な考察を行った。

## 第二章 18S rDNA および ITS 領域の塩基配列に基づく射出胞子形成酵母の系統関係

### 第一節 緒言

近年、分子生物学の発達により、核 DNA の塩基配列が比較的容易に得られるようになり、生物間の系統学的関係を類推することができるようになってきた。微生物分類学では、種、属あるいはそれ以上の高次分類群における系統関係について議論が行われている。細菌においては Woese (1987) が 16S rDNA 塩基配列に基づく高次分類群について述べ、また、種についても、Stackebrandt と Goebel (1994) が、DNA 相同値と、16S rDNA 塩基配列の類似度についての報告している。しかし、細菌に比べると、菌類に関する 18S rDNA などの情報量は極めて少ない。担子菌系酵母においては、代表的な種についての報告はあるが (Bruns et al., 1992; Swann and Taylor, 1993, 1995; Suh and Sugiyama, 1993a, 1994; Suh and Nakase, 1995)、未だその全貌を見渡せるほどのデータが報告されていないのが現状である。

射出胞子形成酵母については、Nakase ら (1993) は、逆転写酵素を用いて rRNA を直接シーケンスし、射出胞子形成酵母 52 種の部分塩基配列に基づく系統関係について報告した。また、Fell ら (1995) は、射出胞子形成酵母を含む担子菌系酵母の 26S rDNA の部分塩基配列に基づく系統について報告している。18S rRNA および 26S rDNA の部分塩基配列に基づく系統樹から、当初、独自の分類群をなすと考えられてきた射出胞子形成酵母は、担子菌類の 3 つの綱のすべてに他の担子菌類と混在しており、単系統ではないことが明らかとなった。これは、射出胞子形成能をもつ酵母の系統を明らかにすることは、担子菌類全体の系統関係について演繹することが可能であることを示すものである。そこで、射出胞子形成酵母の種の基準株について、18S rDNA 塩基配列の決定を行い、系統学的位置を調べた。また、18S rDNA の塩基配列の決定を行った中で、*Bensingtonia ciliata* JCM 6865、*B. yamatoana* JCM 2896、および *Tilletiopsis flava* JCM 5186 の 3 株に group I intron と推定される塩基の挿入があった。これら group I intron の系統関係と 18S rDNA エクソン部分の系統関係についても比較を行った。

最近では、Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の塩基配列が、系統的に近縁な種間では、遺伝子の中で保存性の高い 18S rDNA 塩基配列などに比較し、系統関係の指標としてより適切であると報告されている (James et al., 1996)。James らは報告の中で、18S rDNA の差が 1.8% の *Zygosaccharomyces* 属の場合、ITS の配列による区別が可能であったと述べている。そこで、射出胞子形成酵母の内、サビキン綱の各サブクラスターに位置する *Sporobolomyces* 属を取り上げ、ITS の塩基配列に基づく遺伝距離を算出し、18S rDNA に基づく遺伝距離と比較を行

った。

## 第二節 18S rDNA に基づく射出胞子形成酵母の系統関係

射出胞子形成酵母の内、*Bensingtonia* 属および *Tilletiopsis* 属、および *Tilletiaria anomala* について 18S rDNA 塩基配列の決定を行った。他の射出胞子形成酵母については、*Bullera* 属、*Kockovaella* 属および *Udeniomyces* 属は Suh と Nakase (1995) および Suh ら (1996a, 1996c) が、また、*Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属については Hamamoto と Nakase (in preparation) が決定を行っている。

### 1. 材料および方法

#### 1.1. 供試菌株

塩基配列の決定を行った菌株は、*Bensingtonia* 属の基準株 9 株、*Tilletiopsis* 属の基準株 6 株および *Tilletiopsis* 属と近縁と推定されているが、その系統学的位置の明らかではなかった *Tilletiaria anomala* 1 株である。Table 2.1 に DDBJ の登録番号と共に示した。

Table 2.1. Yeast strains used in this study and DDBJ accession numbers of their 18S rDNA sequences.

Scientific name	JCM No.	Other designations	DDBJ accession number
<i>Bensingtonia ciliata</i>	JCM 6865	=CBS 7514 =IFO 10577	D38233
<i>Bensingtonia ingoldii</i>	JCM 7445	=CBS 7424 =IFO 10578	D38234
<i>Bensingtonia intermedia</i>	JCM 5291	=ATCC 66425 =BKM Y-2720 =CBS 7226 =IFO 10178 =KCTC 7207	D38235
<i>Bensingtonia miscanthi</i>	JCM 5733	=CBS 7282 =IFO 10579	D38236
<i>Bensingtonia naganensis</i>	JCM 5978	=CBS 7286 =IFO 10580	D38366
<i>Bensingtonia phylladus</i>	JCM 7476	=CBS 7169 =IFO 10581	D38237
<i>Bensingtonia subrosea</i>	JCM 5735	=CBS 7283 =IFO 10582	D38238
<i>Bensingtonia yamatoana</i>	JCM 2896	=CBS 7243 =IFO 10583 =NRRL Y-17308	D38239
<i>Bensingtonia yuccicola</i>	JCM 6251	=CBS 7331 =NRRL Y-17310	D38367
<i>Tilletiaria anomala</i>	JCM 6353	=ATCC 24039 =CBS 436.72 =IFO 9559 =UBC 951	D83193
<i>Tilletiopsis albescens</i>	JCM 5182	=ATCC 24343 =CBS 608.83 =UBC 926	D83188
<i>Tilletiopsis flava</i>	JCM 5186	=CBS 401.84 =IFO 6833	D82819
<i>Tilletiopsis fulvescens</i>	JCM 5187	=ATCC 24344 =CBS 607.83 =UBC 8006	D83189
<i>Tilletiopsis minor</i>	JCM 8361	=ATCC 10764 =CBS 543.50 =IMI 56590	D83190
<i>Tilletiopsis pallescens</i>	JCM 5230	=ATCC 24345 =CBS 606.83 =UBC 8007	D83191
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	JCM 8362	=ATCC 36489 =CBS 544.50	D83192

#### 1.2. 塩基配列の決定方法

18S rDNA および ITS 領域の塩基配列の決定には以下の 3 通りの方法を

使用した。以下の3通りの方法は時間の経過と共に分子生物学的手法が発達し、また汎用化されてきた段階をしめすもので、最近では当初に比べ、比較的少ない労力で塩基配列データが得られるようになっている。現在、おもに使用しているのはc)の方法である。

a) PCR-RIを用いた直接シーケンシング法

本方法は Takashima ら (1995a) に述べた通り、polymerase chain reaction (PCR) を用いて 18S rRNA 遺伝子を増幅し、PCR 産物を精製、これを用いてシーケンシング (sequencing) を行う方法である。

PCR 用の DNA は菌体を超音波で破碎し、調製した。PCR には TaKaRa Taq (Takara, Otsu) を用い、Table 2.2 に示したプライマーの内、P1 および P2 を使用した。PCR は 95°C 4 分間の熱変性の後、94°C 1 分、55°C 2.5 分、72°C 2.5 分の反応を 30 サイクル行ったのち、72°C で 10 分間保持した。PCR 産物を 1% アガロースで電気泳動後、バンドを切り出し、Sephaglass Bandprep Kit (Pharmacia P-L Biochemicals, Milwaukee, WI, USA) を用いて精製した。これを、 $[^{35}\text{S}]$ dATP  $\alpha$  S および Sequenase ver. 2.0 (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH, USA) を用いて、直接シーケンシング反応を行った。反応に用いたプライマーは Table 2.2 に示した。シーケンシング反応後、8% アクリルアミド-8 M 尿素ゲルで電気泳動を行い、泳動結果はオートラジオグラフィ後、目視で解読した。

b) PCR-クローニング-直接シーケンシング(サイクルシーケンシング)法

本方法は Takashima と Nakase (1996) に述べた通り、PCR 産物である 18S rDNA のクローニングを行い、これのシーケンシングを行う方法である。オートシーケンサー導入当時、PCR 産物を直接シーケンシングすることは可能であったが、効率が非常に悪かったため、本方法を用いた。

18S rRNA 遺伝子の PCR は上記 a) の方法を用いた。PCR 産物 100  $\mu$ l にエタノールを加えてこれを沈澱させ、10  $\mu$ l のミリ Q 水に溶解した。18S rDNA 溶液 1  $\mu$ l を pI7Blue T-vector (Novagen, Madison, WI, USA) および TaKaRa Ligation Kit ver. 1 (Takara) を用いて、クローン化した。クローン化した 18S rDNA の両鎖の塩基配列を AutoRead Sequencing Kit および Autocycle Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて、ジデオキシ法により決定した。塩基配列の解読は ALF express DNA sequencer (Pharmacia Biotech) を用いて行った。用いたプライマーはキットに添付の M30 の-40 および reverse primer、および Table 2.2 に示したものをを用いた。

Table 2.2. Primers used for amplifying and sequencing of 18S rDNA and ITS regions

Primer (position in <i>S. cerevisiae</i> ) Sequence		
PCR primers		
P1: 2-21		5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
P2: 1794-1775		5'-GATCCTTCGCGAGGTTCCACC-3'
ITS1: 1755-1778		5'-GTCTGAACAAGGTTCCGTAGGTG-3'
ITS4: 173-154*		5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Sequencing primers for direct sequencing method using <sup>32</sup> S		
Forward primers		
C: 459-463		5'-GAGGTAGTGACAATA-3'
DR: 508-520		5'-ATTGGAATGAGTACA-3'
E: 617-631		5'-TTAAAAGCTCGTAG-3'
F: 793-807		5'-ATTAGCATGGAATAA-3'
I: 1373-1387		5'-CTTCTTAGAGGGACT-3'
K: 1562-1576		5'-TCTTCAACGAGGAAT-3'
Reverse primers		
U1: 583-566		5'-GAATTACCGCGGCTGCTG-3'
U2: 1147-1127		5'-CCGTCAATTCCTTAAAGTTT-3'
U3: 1841-1827		5'-ACGGCGGTGTGTAC-3'
A: 184-170		5'-ATGTATTAGCTCTAG-3'
B: 322-308		5'-CGAAAGTTGATAGGG-3'
D: 519-505		5'-GTACTCATTCCAATT-3'
G: 913-899		5'-CCAAGAATTCACT-3'
H: 1328-1314		5'-TCTCGTTCGTTATCG-3'
J: 1473-1458		5'-CAGTGTACGCGCGT-3'
L: 1239-1224		5'-TCAATCTGTCAATCC-3'
Cy5 labelled primers for cycle sequencing <sup>†</sup>		
Forward primers		
2F: 2-21		5-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
404F: 404-423		5-GCTACCACATCCAAGGAAGG-3'
834F: 934-954		5-CTGCGAAAGCATTGCGAAGG-3'
SIJF: 1449-1473		5-TCTGGGCGCACGCGGCTACACTG-3'
ITS1: 1755-1778		5-GTCTGAACAAGGTTCCGTAGGTG-3'
Reverse primers		
UNVR-01: 588-563		5-TGGAATTACCGCGGCTGCTGCCACC-3'
UNVR-02: 1148-1124		5-CCGTCAATTCCTTAAAGTTTCAGCC-3'
UNVR-03: 1643-1619		5-GACGGCGGTGTGTACAAAGGGCAG-3'
ITS4: 173-154*		5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
U1.5: 955-934		5-TCCTTGGCAAATGCTTTCGCAG-3'
U2.5: 1333-1315		5-AAGTCTCGTTCGTTATCG-3'

\* Corresponding position in the LSU rDNA sequences of *S. cerevisiae*.

† Sugita and Nakase (submitted).

## c) PCR-サイクルシーケンシング法

本方法は Sugita と Nakase (submitted) に述べた通り、PCR を用いて 18S rRNA 遺伝子を増幅し、PCR 産物を精製、これを用いて直接シーケンシングを行う方法である。上記 a) の方法と同様であるが、a) ではアイソトープを用いてシーケンシング反応後、電気泳動を行い、ラダーを目視により認識していたのに対して、本方法ではシーケンシング反応後、これをオートシーケンサーによって解析した。

18S rRNA 遺伝子の PCR は上記 a) の方法を用いた。PCR 産物 100  $\mu$ l はフィルターを用いて精製した。次いで、18S rDNA の塩基配列を SequiTherm Long-Read Cycle Sequencing Kit (Epicentre Technologies Corp., WI, USA) を用いてジデオキシ法により決定した。塩基配列の解釈は ALF express DNA sequencer を用いて行った。用いたプライマーは Table 2.2 に示した。

ITS 領域の塩基配列の決定は、PCR プライマーに ITS1 および ITS4 を用いて rDNA の増幅を行った。また、18S rDNA 中に group I intron があつた場合には、PCR のプライマーに P1 および ITS4 を用いた。

### 1.3. 系統解析

得られた塩基配列、および発表されている関連菌株の塩基配列を用いて、系統樹を作成し、系統学的解析を行った。アラインメントには CLUSTAL W (Thompson et al., 1994)を用い、得られた結果を目で見て修正を加えた。その後、系統樹の作成に供した。

系統樹の作成は、距離行列法の一つである近隣結合法(Neighbor-joining method, Saitou and Nei, 1987)を用いた。各菌株間の遺伝距離は Kimura (1980)の 2-parameter 法を用い、ギャップを除いて算出した。また、各系統枝の統計的な確率の推定には、ブーツストラップ (Felsenstein, 1985)法を用いた。

## 2. 結果と考察

### 2.1. *Bensingtonia* 属の系統

塩基配列の決定には、方法 a)を用いた。*Bensingtonia* 属 9 種の基準株の内、*B. ciliata* JCM 6865 および *B. yamatoana* JCM 2896 を除く 7 株については、PCR プライマー部分を除いて、約 1750 塩基を決定した。*B. ciliata* JCM 6865 および *B. yamatoana* JCM 2896 は 18S rDNA として推定される通常の長さよりも大きかったが、これはそれぞれ 2 つの group I intron を含んでいたためであった。系統学的解析は、group I intron 部分を除いて行った。また、これら group I intron については、第三節に他の group I intron と併せて考察した。

関連菌類とのアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2.1)。*Bensingtonia* 属はサビキン綱のクラスターに位置しており、射出胞子を形成しない種と混在した。本クラスターはさらに 3 つのサブクラスター (2a, 2b および 2c)に分かれており、*Bensingtonia* 属はこの内の 2 つのサブクラスターに分かれて位置していた。*Bensingtonia* 属の基準種である *B. ciliata*、および *B. ingoldii*、*B. miscanthi*、*B. naganoensis*、*B. phylladus*、*B. subrosea* および *B. yuccicola* はサブクラスター 2a に位置していた。また、*B. intermedia* および *B. yamatoana* の 2 種は *Sporobolomyces roseus*、*Rhodospodium toruloides* などと共にサブクラスター 2b を形成した。Fell ら (1995) の 26S rDNA の部分塩基配列に基づく系統樹も本結果を支持した。

*Bensingtonia* 属は 1986 年、Ingold によって、射出胞子を形成する分離株 1 株 (*Bensingtonia ciliata*) に対して設立された属である。後に、菌体にキシロースを含まないこと、および主要ユビキノンが Q-9 であることが明らかとなり (Boekhout, 1987)、1988 年、Nakase と Boekhout は *Sporobolomyces* 属のうち、主要ユビキノンが Q-9 の、それまで“intermedius group”と呼ばれていた 6 種をこの属に統合した。本属は化学分類学的には、菌体にキシロースを含まず、主要ユ



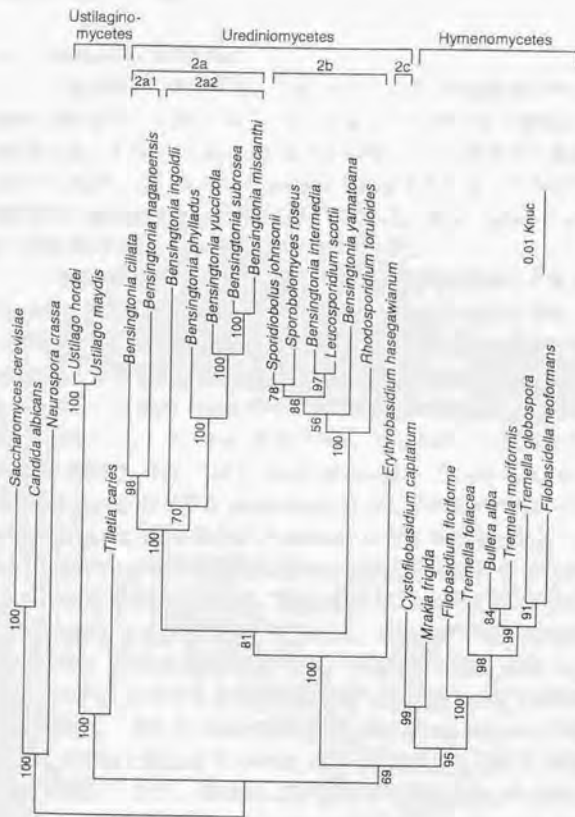


Fig. 2. 1. Phylogenetic tree of *Bensingtonia* species and related taxa based on 18S rDNA sequences. The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1,574 positions, using the neighbor-joining methods (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the percentages from 1,000 replicate bootstrap sampling.

ピキノンが 0.9 と均一である。しかし、系統解析の結果から、*Bensingtonia* 属は少なくとも 2 つの系統 (2a および 2b) から成ることが推察された。また、同一サブクラスター内でも、*Bensingtonia* 属のそれぞれの種の 18S rDNA の遺伝距離はあまり近くなく、例えば、*B. ciliata* (2a1) と *B. ingoldii* (2a2) の場合、0.088 Knuc である。従って、これら *Bensingtonia* 属の種は他の属の種と混じって存在するであろうと思われる。

## 2.2. *Tilletiopsis* 属の系統

塩基配列の決定には、方法 b) を用いた。供試菌株の内、*Tilletiopsis flava* JCM 5186 を除く 6 株については、PCR プライマー部分を除いて、約 1750 塩基を決定した。*T. flava* JCM 5186 は 18S rDNA として推定される通常の長さよりも大きかったが、これは 3 つの group I intron を含んでいたためであった。系統学的解析は、group I intron 部分を除いて行った。また、group I intron については、第三節に他の group I intron と併せて考察した。

関連菌類とのアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2.2)。*Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria anomala* はクロボキン綱のクラスターに位置しており、クロボキン綱はさらに 2 つのサブクラスター (1a および 1b) に分かれた。このうち、*Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria anomala* はサブクラスター 1b に位置し、*Tilletia caries* や不完全酵母の *Sympodiomyces paphiopedili* と系統枝を形成した。*Tilletiopsis* 属はさらに、99.9% のブーツストラップ確率で、1b1 と 1b2 に分かれ、1b1 では *T. washingtonensis*、*T. pallenscens* および *T. albescens* が *Tilletia caries* および *S. paphiopedili* と共に系統枝を形成した。また、*T. minor*、*T. fulvescens*、*T. flava* および *T. anomala* は 1b2 を形成した。

*Tilletiopsis* 属は形態が *Tilletia* 属の種に似ているところから Derx (1930) によって設立された属である。後の 1948 年、Derx はラテン記載を行って、当初の *Tilletiopsis* sp. 4 を基準種に指定した。しかしながら、この株はすでに死滅していたため、Nyland (1950) は、Derx が基準種に指定した large-spored species (*Tilletiopsis* sp. 4) にもっとも近いものとして *Tilletiopsis washingtonensis* を新基準種に指定し、また *T. minor* を Derx の small-spored species に相当するとした。その後、Tubaki (1952) は *T. cremea* と *T. lilacina* の 2 種と *T. minor* var. *flava* の 1 変種を報告し、また、Gokhale (1972) は *T. albescens*、*T. fulvescens* および *T. pallenscens* を報告した。後に、Boekhout (1991a) は *T. minor* var. *flava* を生理生化学性状および G+C 含量の違いに基づき、*T. flava* として独立させた。これら 8 種の内、*T. cremea* と *T. lilacina* は生理生化学的性状 (Boekhout, 1991a; Yamazaki et al. 1985) や核型電気泳動の結果 (Boekhout et al. 1992a) が *T. washingtonensis* とよく似ていることから、現在では *T. washingtonensis* のシノニムとして扱われている。

本実験では、*Tilletiopsis* 属として報告されている 8 種の内、*T. washing-*

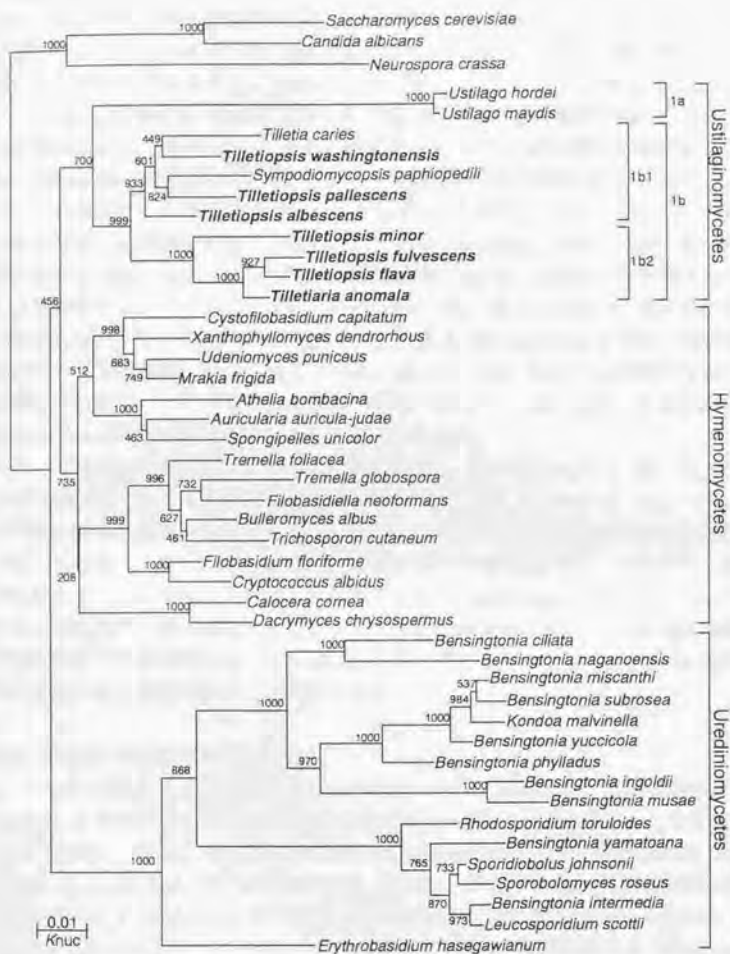


Fig. 2.2. Phylogenetic tree of *Tilletiopsis* species, *Tilletiaria anomala* and related taxa based on 18S rDNA sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1,555 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicate bootstrap sampling.

*tonensis* のシノニムとされている、*T. cremea* および *T. lilacina* を除く 6 種の基準株の 18S rDNA 塩基配列の決定を行った。その結果、*Tilletiopsis* 属 6 種は Derx が述べたように、*Tilletia* 属と近縁であることが示された。また、射出胞子を形成しない不完全酵母である *S. paphiopedili* も同じクラスターに位置していた。

*Tilletiopsis* 属の種は、従来、射出胞子の形態が長い鎌形であり、また、出芽細胞を持たず菌糸のみによって増殖するという、形態的な特徴によって *Sporobolomyces* 属と区別されていた。化学分類学的性質は両属共に、菌体にキシロースを含まず、また主要ユビキノンは Q-10 である。しかし、*Tilletiopsis* 属のある種は、出芽細胞を持つと報告されており (Boekhout, 1998)、また、射出胞子の形も *T. albescens* のように典型的な鎌形の射出胞子とは異なった形態を示すものも存在する。このような場合、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属の区別が付きにくい。一方、系統的には、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属は、担子菌類の中の 2 つの異なった綱に属している。従って、18S rDNA の塩基配列などの塩基配列を決定し、系統的な位置を調べることにより、*Tilletiopsis* 属あるいは *Sporobolomyces* 属の識別を行うことが可能であろう。

*Tilletiaria anomala* は、射出胞子を産生し、有性世代を持つ一属一種一株の酵母様菌類である。本菌株の高次分類群については、Bandoni と Johri (1972) が記載の時に、形態的な特徴から黒穂菌、とくに *Tilletiaceae* 科と近縁であろうと述べている。しかし、5S rRNA 塩基配列に基づく系統樹では、クロボキン菌のクラスターとは異なった位置にあったことから (Blanz and Gottschalk, 1984)、本種の系統的な位置は曖昧であるとされてきた。本実験において、18S rDNA 塩基配列に基づく系統樹から、*T. anomala* はクロボキン綱に位置し、*Tilletia* 属や *Tilletiopsis* 属と近縁であることが示された。

### 2.3. 射出胞子形成酵母の全体像

本実験により決定した、*Bensingtonia* 属、*Tilletiopsis* 属、*Tilletiaria anomala* に、*Bullera* 属、*Kockovaella* 属、*Udeniomyces* 属 (Suh and Nakase, 1995; Suh et al., 1996a, 1996c)、および *Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属 (Hamamoto and Nakase, in preparation) のデータを加えて、射出胞子形成酵母および関連菌類の系統樹を作成した (Fig. 2.3)。用いた関連菌類の塩基配列の登録番号は Appendix 1 に示した。図中に示したクラスターの番号は、それぞれ、既に発表した Takashima ら (1995a)、Suh ら (1996a) および Takashima と Nakase (1996) の通りである。

前述した、*Bensingtonia* 属はサビキン綱に、*Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria anomala* はクロボキン綱に他の担子菌類と共に位置していた。また、同じく射出胞子を形成する *Bullera* 属、*Kockovaella* 属および *Udeniomyces* 属は菌茸綱 (Suh and Nakase, 1995; Suh et al. 1996a; Suh et al., 1996c) に、*Sporobolomyces* 属はサビキン綱 (Hamamoto and Nakase, in preparation) に位置していた。

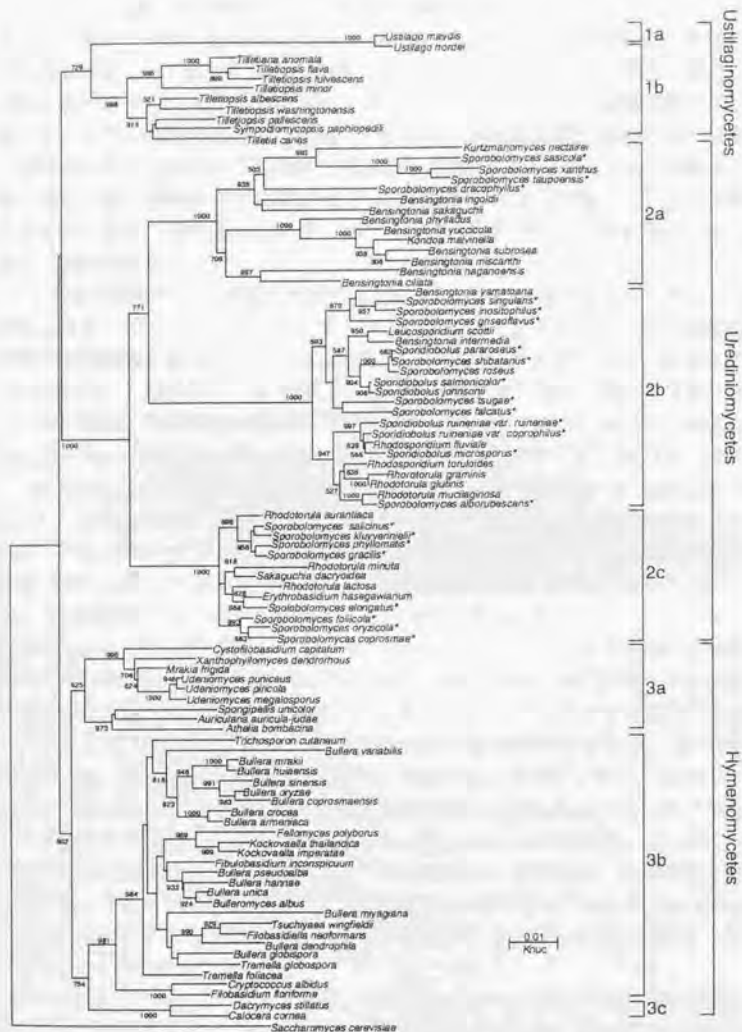


Fig. 2.3. Phylogenetic tree of ballistostadium-forming yeasts and related taxa based on 18S rDNA sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1489 positions using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicate bootstrap sampling. \*, Yamamoto and Nakase, in preparation.

担子菌類の系統樹において、3つの網の成す樹形は、アラインメントの仕方や、各網の OTU (Operational Taxonomic Unit, 系統樹の場合は塩基配列) の数による影響によって変わることがある。Fig. 2.3 では、まず、クロボキン網とサビキン網がクラスターを形成し(ブーツストラップ 27%), 次に菌茸網がこの2網とクラスターを形成した。しかし、クロボキン網と菌茸網が最初にクラスターを形成することも多い。これは、18S rDNA 塩基配列のデータに偏りがあるため、未だ、担子菌類の3つの網の成す樹形を議論することが難しいことを示唆するものである。真の樹形を構築するためには、さらにデータの蓄積が必要であると推定される。

担子菌類の3つの網はそれぞれさらに、いくつかのサブクラスターに分かれている。そこで、サブクラスター間、および各サブクラスター内の塩基配列間の遺伝距離を調べた。サビキン網は3つのサブクラスター(2a, 2b および 2c)に分かれ、これらはブーツストラップ 100%で支持された。同一サブクラスター内の塩基配列間の遺伝距離は、それぞれ、0.010 - 0.099 (2a), 0.001 - 0.043 (2b) および 0.003 - 0.021 (2c) *Knuc* であった。また、各サブクラスター間では、0.090 - 0.126 (2a vs. 2b), 0.072 - 0.116 (2a vs. 2c) および 0.071 - 0.090 (2b vs. 2c) *Knuc* であった。この結果から、2b および 2c はサブクラスター内で比較的近縁であるのに対し、2a は同一サブクラスター内でも遺伝的な距離があると推定された。従って、新たな菌株が2aに加わった場合、2aはさらに細分されると思われる。

菌茸網も3つのサブクラスター(3a, 3b および 3c)に分かれたが *Udeniomyces* 属が位置するサブクラスター3aのブーツストラップ値は63%と低かった。Suh と Nakase (1995) および Suh ら (1996a) は用いるアルゴリズムを変えて系統樹の作成したところ、常にこれらの3つのクラスターに分かれたと述べている。同一サブクラスター内の塩基配列の類似度を調べると、3aでは *Udeniomyces* 属同士の遺伝距離はそれぞれ0.005 *Knuc* 以下で、また、3a内では0.005 - 0.059 *Knuc* であった。また、3b内では0.004 - 0.079 *Knuc* であった。また、各サブクラスター間では、0.041 - 0.094 (3a vs. 3b), 0.060 - 0.070 (3a vs. 3c) および 0.060 - 0.085 (3b vs. 3c) *Knuc* であった。この結果から、菌茸網は、酵母形をとるものがキノコなどと混在し、形態的には極めて多様に富んでいるが、18S rDNA 塩基配列を比較すると、系統的にはサビキン網よりも近縁な種同士のクラスターであることが示唆された。

上述したように、担子菌類の3つのクラスターはそれぞれ細胞壁の糖組成によって識別される。しかし、各網の中のサブクラスターを区別する表現形質は未だ明らかになっていない。Stackebrandt ら (1997) は 16S rDNA 塩基配列に基づいて、Actinobacteria 網の中に目、亜目および科を提唱した。そして、これらの分類階級の区別は、従来の形態や化学分類学的指標に基づく方法では不可能であり、16S rDNA 保存領域の sequence signature によって行うのが適当であると

述べている。Actinobacteria 綱の、各亜目間の塩基配列の遺伝距離を調べると、約 0.1 Knuc であった。担子菌系酵母に Actinobacteria 綱の場合をそのまま当てはめることができないが、サピキン綱の場合、各サブクラスター間の類似度はいずれも約 0.1 Knuc であることから、これらサブクラスターは Actinobacteria 綱の亜目あるいは目に相当するものと推定される。従って、表現形質によるこれらサブクラスターの識別は、かなり困難なものと推察される。しかしながら、Actinobacteria 綱の場合、他の綱との区別も sequence signature によってしか行えないが、担子菌類の各綱は細胞壁の糖組成により区別されることから、同様に、これらサブクラスターを識別する表現形質が存在する可能性もある。これを探索してゆくことが今後の課題である。

### 第三節 射出孢子形成酵母の 18S rDNA に存在する group I intron

Group I intron は、真核生物の核 DNA およびミトコンドリア、プラスミド、シアノバクテリア、バクテリオファージなどの遺伝子に存在することが知られている。真核生物の核 DNA の group I intron としては 26S および 18S rDNA に存在することが知られている。18S rDNA に存在する group I intron としては子囊菌類である *Pneumocystis carinii* (Sogin and Edman, 1989) および *Protomyces inouyei* (Nishida et al., 1993)、担子菌類では *Ustilago maydis* (DeWachter et al., 1992)、*Rhodosporiidium dactyloides* (Suh and Sugiyama, 1994)、*Lentinellus montanus* (Hibbett, 1996)、*L. ursinus* (Hibbett, 1996)、*Clavicornia pyxidata* (Hibbett, 1996)、*Panellus stypticus* (Hibbett, 1996) などが知られている。また、緑藻類や褐藻類からも報告されている。地衣を形成する子囊菌 *Cladonia chlorophaea* (DePriest and Been, 1992) や *Lecanora dispersa* (Gargas et al., 1995) の 18S rDNA には複数個の group I intron が発見されている。Gargas (1995) らは、系統的に離れた生物種においてもこれら group I intron の挿入位置は保存されていると指摘している。

18S rDNA の塩基配列の決定を行った株の内、*Bensingtonia* 属の 2 種、*B. ciliata* JCM 6865 および *B. yamatoana* JCM 2896、および *Tilletiopsis flava* JCM 5186 の 18S rDNA は推定される通常のサイズよりも大きかった。塩基配列の決定の結果、*B. ciliata* JCM 6865 および *B. yamatoana* JCM 2896 はそれぞれ 2 つの、また *Tilletiopsis flava* JCM 5186 は 3 つの塩基挿入部分があった。一次構造の比較をおこなったところ、チミンのあとに挿入し、グアニンが最終塩基であるという、group I intron の特徴を備えていた。また、group I intron の保存領域と呼ばれている P、Q、R および S の 4 つの配列 (Cech, 1988) も存在するので、これらの挿入配列は group I intron と推定された。そこで、これら group I intron の系統関係と 18S rDNA エクソン部分の系統について比較を行った。

#### 1. 材料および方法

### 1.1 Group I intron の挿入位置と推定二次構造

Group I intron が存在したのは *Bensingtonia ciliata* JCM 6865, *B. yamatoana* JCM 2896 および *Tilletiopsis flava* JCM 5186 の3株である。Fig. 2.4.1-3 に各株の 18S rDNA の配列を示した。図の内、太字で示したのが group I intron 部分の配列である。

各 group I intron の挿入位置は Gargas ら (1995) の提唱した表記に従って行った。また、group I intron のグルーピングを行うために二次構造の予測を行った。推定二次構造は Cech ら (1995) の方法に従って描いた。

### 1.2. 保存領域に基づく系統学的解析

報告されている group I intron はサイズが 200 塩基くらいのもから 1,000 塩基を越えるものまで存在し、これを通常の方法によってアラインメントを行うことは不可能である。しかしながら、どの group I intron にも P、Q、R および S と呼ばれるいわゆる保存領域があることが特徴である。そこで、アラインメントは文献および World Wide Web で公開されているデータベース (Damberger and Gutell, 1994) から得られる推定二次構造を基本に目視で行った。まず、P、Q、R および S 部分を、次いで P2、P2.1、P3、P4、P5、P6、P7、P8 および P9.0 領域を推定二次構造をもとに追加し、アラインメントを行った。アラインメントの結果、160 塩基を系統解析に用いた。解析方法は PHYLIP package ver. 3.51c (Felsenstein, 1993) 中の dnaml を用いた。プログラム中の transition/transversion は 2.000000 とした。また、本解析に用いた、18S rDNA のエクソン部分の系統学的解析には、CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) によってアラインメント後、PHYLIP 中の neighbor を用いた。各塩基配列間の遺伝距離は、Kimura (Kimura, 1980) の方法によって求めた。

## 2. 結果と考察

### 2.1. Group I intron の挿入位置と挿入イントロンの構造的特徴

18S rDNA に相当する遺伝子のサイズは *B. ciliata* JCM 6865 は 2,427 bp、*B. yamatoana* JCM 2896 は 2,658 bp で、挿入位置は 943 と 1506 であった。また *T. flava* JCM 5186 は 2,871 bp で挿入位置は 516、1199、および 1506 であった。挿入配列の大きさは *B. ciliata* JCM 6865 は 335 nt (挿入位置 943) および 341 nt (挿入位置 1506)、*B. yamatoana* JCM 2896 は 454 nt (挿入位置 943) および 457 nt (挿入位置 1506) であった。*T. flava* JCM 5186 は 325 nt (挿入位置 516)、335 nt (挿入位置 1199) および 437 nt (挿入位置 1506) であった。これらはそれぞれチミンの次から始まり、グアニンで終わる group I intron の特徴を持っており、また、P、Q、



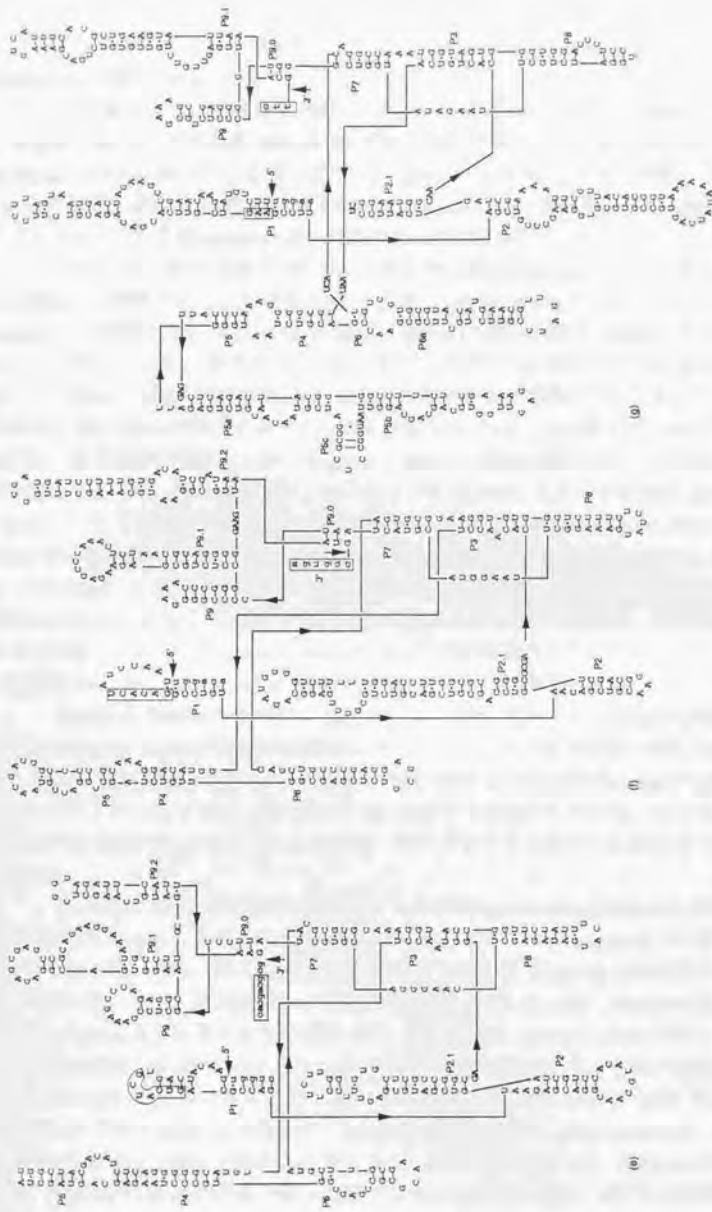


1 atgtgtgtgaa tccgtgcaat agtctatgag tigtctcaaa gattaagcca tgcatagca tgcatagca  
 61 agtataaaca aactatactg tgaatactgg atgtgtctat caatacagtt atgtttatt  
 121 tgaatgtaact tgcatactgg taactatgag taactctaga caatacact gcttataaag  
 181 gctactctac gaagaccgct acttattaga taagaaoaaa tccctctggg tccctctggt  
 241 gaactaatat aattttcttg atgcctatgg tctgtctggc cgcctctgca tctcaatctc  
 301 tgcctataca actttctatg tggatgataa ggcctaacat gtttgaacg gttcaagcggg  
 361 aataaggtt agttctcggg gggatgagct gagaacagg taobactcc aagaaagagca  
 421 gaaagggcgc aaattctaca atccagcaac gggagatgag tgaactaaa taactata  
 481 gggcctttcc gttctctaca tggatgtag taactattaa tccctctaac gggagcaatt  
 541 ggggggaaag tctgttgaaac atcaatgctta tcaatctaac tccctctaac gggagcaatt  
 601 cctctctatgc aagcaagatt tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 661 gactctctca acctctgatt ctatctcag ctatctctca tccctctctg tccctctctg  
 721 aacccctcca aagctctcag tctattctca tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 781 cctctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 841 aagatactcc tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 901 cccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 961 gctctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 1021 gaccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 1081 aggtctctca aagcaatgta tggctgctgc tttatgctg ggttaaccg acttttact tgaataatc  
 1141 ggggtctaca tgggtgctgt tctgcaactg ccgcaatgt taatggagc gattggggg  
 1201 atgtatctc actgcttaga tctgcaatc ttgtatttt tgaagctaa ctgactgpyan  
 1261 agttttcc aagggcttc tctatctaa agaacaaay ttgggggag gtaacagat  
 1321 aatacagtt gttcttca cagtaacta tgcctctag gttctgggy atgtattct  
 1381 ttgaactcgc tccpcaactt tccgaaact tccgaaact aagctcttg gttctgggy gaaatggt  
 1441 cgaagcty aaattaaag aaattgaag aagctctca ccaggatg agctctgag  
 1501 taatttga ccaacagcty gaaactaac aggtctcagc atagtanga tgaacagat  
 1561 gatagctct tctgtactt atgggttgg tttgctggg gttcttatt gttgagtag  
 1621 ttgtctctg taactcag atcgaagag acttcaact gctaaatag ccggctaac  
 1681 ttgttggct gtagctct tggggagct attagctg apataatga agttgagc  
 1741 aatacaagtt taactctca tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 1801 cctctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg tccctctctg  
 1861 cagaaatcc cccctctca atccctcag atccctcagc gattctctg cccctctctg tccctctctg  
 1921 cccaaatctgc gaaatgctt ggtgtttct tctatgagc cttatgctc gttatgctc  
 1981 cccctctca cccctctct tccctctca tccctctca tccctctca tccctctca  
 2041 gaaatctca cctttctcag tctctctg tctctctg tctctctg tctctctg  
 2101 agttctggy tgaagcggc tctctctg tctctctg tctctctg tctctctg  
 2161 gaagctggy tgaactgt gaaactctg tctctctg tctctctg tctctctg  
 2221 tctctcaag agaatctt atgaagctg agctctcag tctctctg tctctctg  
 2281 cctttctca ccaacctctg tctctctg tctctctg tctctctg tctctctg  
 2341 tggctctgc gaaagcaaa agctctca tctctctg tctctctg tctctctg  
 2401 taagagagat acaagctca ccaagctct tctctctg tctctctg tctctctg  
 2461 cctctctca aagctctca tctctctg tctctctg tctctctg tctctctg  
 2521 aaaaatctg aaaaatctg aaaaatctg aaaaatctg aaaaatctg aaaaatctg  
 2581 cccctctca cccctctca cccctctca cccctctca cccctctca cccctctca  
 2641 gttatctca gttatctca gttatctca gttatctca gttatctca gttatctca  
 2701 tctctctca tctctctca tctctctca tctctctca tctctctca tctctctca  
 2761 cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca  
 2821 cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca cctctctca

Fig. 2.4.3. *Tillalopsis ilava* (JCM 5186) 18S rRNA gene (D82819).  
 Boldface indicates group I junctions.







R および S のいわゆる保存領域を有していたので group I intron と推定された (Burke et al., 1987; Cech, 1988)。

一次構造から二次構造を推定し、Fig. 2.5 に示した。推定二次構造から *B. ciliata* JCM 6865 および *B. yamatoana* JCM 2896 のそれぞれ2つの group I intron は subgroup IC1 に属することが、また、*T. flava* JCM 5186 については挿入位置 516 および挿入位置 1199 の group I intron は subgroup IB3。また挿入位置 1506 のイントロンについては subgroup IC1 に属すると推定された。

Table 2.3 に真核生物の 18S rRNA 遺伝子における group I intron の共通挿入位置として報告されている位置の内、7箇所 group I intron について示した。Gargas ら (1995) は 18S rDNA には 17 箇所の group I intron の挿入位置があると述べているが、この内 10 箇所については、まだ 1 例ずつしか報告されていない。従って、Table には 17 箇所の内、2 例以上の報告がある 7 箇所について記した。供試株の 18S rDNA に挿入のあった、挿入位置 516、943、1199 および 1506 はそれぞれ、他の菌類や藻類などからも group I intron の挿入が報告されている普遍的な位置であった。担子菌類では、以下のイントロンが、これらの位置の group I intron として報告されている: *R. dacr516* (*Rhodospiridium dactyloides*), *U. mayd943* (*Ustilago maydis*), *L. omph943* (*Lentinellus omphalodes*), *L. mont242-943* (*L. montanus*), *L. mont246-943* (*L. montanus*), *L. ursi943* (*L. ursinus*), *C. pyxi943* (*Clavicornia pyxidata*), *P. styp943* (*Panellus stypticus*)。このことから、担子菌類の3つの綱のいずれにも group I intron をもった株が報告されているが、その挿入位置は 516、943、1199、1506 等で保存されていると推定される。

Michel と Westhof (1990) は、group I intron はその配列、特に活性中心を構成する部分 (core region) の配列の特徴からさらにいくつかのサブグループにわかれると述べた。Damberger と Gutell (1994) は、18S rDNA に見出された group I intron はおもにサブグループ IB1、IB3 および IC1 に属すると報告している。そこで、射出胞子形成酵母の group I intron のグルーピングを行うために二次構造を予測を行った。

挿入位置 516 においては、*A. grif516* および *Naegleria* (De Jonckheere, 1994) に発見されているイントロン以外の group I intron はすべて subgroup IB3 に属するものであった。また、挿入位置 1199 においても同様に subgroup IB3 に属するものであった。一方、挿入位置 943 および 1506 のイントロンは、*A. lent943* 以外、すべて subgroup IC1 に属するものであった。Fig. 2.6 は、group I intron を有していた真核生物の 18S rDNA のエクソン部分に基づく系統樹を、イントロンの挿入位置と共に示したものである。この図から、挿入位置 516 および 1199 は、*A. grif516* および *N. grub516* を除いて、subgroup IB3 に属する group I intron の、また、挿入位置 943、1046、1506 および 1512 は、*A. lent943* を除いて、subgroup IC1 に属する group I intron の共通の挿入位置であることが示された。この結果は系

Table 2.3. Group I introns found in the same positions of 18S rDNA

Position	Intron	Size	Subgroup	Source	(GenBank No., Reference)
516	T.6a516	32nt	IB3	<i>Tilletiopsis fava</i> Basidiomycota	(D82819 Takashima and Nakase, 1997)
	R.6a516	40nt	IB3	<i>Rhizoglyphum delectatum</i> Basidiomycota	(D13459 Suh and Sugiyama, 1994)
	C.6a516	30nt	IB3	<i>Chionella kraevikovii</i> A Chlorophyta	(X73997 Huss, direct submission)
	C.6a516	36nt	IB3	<i>Chionella kraevikovii</i> B Chlorophyta	(X73998 Huss, direct submission)
	C.6a516	36nt	IB3	<i>Chionella saccharophila</i> Chlorophyta	(X73991 Huss, direct submission)
	K.6a516	52nt	IB3	<i>Klebsormidium fuscum</i> Chlorophyta	(X75520 Huss, direct submission)
	M.6a516	38nt	IB3	<i>Mycocalicum albonigrum</i> Ascomycota	(L37736 Gargas et al., 1993)
	A.6a516	51nt	IC1	<i>Acanthosomoides griffii</i> Acanthosomoides	(U02540 Gasi et al., 1994)
	H.6a516	131nt	IC1	<i>Hagleria gruberi</i> Scytosizyenia	(X73278 De Jonghewer, 1994)
943	A.6a943	65nt	IB1	<i>Acanthosomoides antiochiata</i> Acanthosomoides	(U02538 Gasi et al., 1994)
	S.6a943	335nt	IC1	<i>Sensingtonia olivata</i> Basidiomycota	(D36233 Takashima et al., 1996)
	B.6a943	454nt	IC1	<i>Bensingtonia yamatana</i> Basidiomycota	(D36228 Takashima et al., 1996)
	U.6a943	411nt	IC1	<i>Ustilago maydis</i> Basidiomycota	(D82396 De Wachter et al., 1992)
	L.6a943	414nt	IC1	<i>Lentihella ornithobolus</i> Basidiomycota	(U59078 Hibbet, 1996)
	L.6a943-943	400nt	IC1	<i>Lentihella mentanus</i> Basidiomycota	(U59076 Hibbet, 1996)
	L.6a943-943	400nt	IC1	<i>Lentihella moranica</i> Basidiomycota	(U59077 Hibbet, 1996)
	L.6a943	400nt	IC1	<i>Lentihella urvina</i> Basidiomycota	(U59081 Hibbet, 1996)
	C.6a943	414nt	IC1	<i>Cleioconia pyxidata</i> Basidiomycota	(U59066 Hibbet, 1996)
	P.6a943	374nt	IC1	<i>Panella stygiosa</i> Basidiomycota	(U59090 Hibbet, 1996)
	P.6a943	340nt	IC1	<i>Protomyces anoyai</i> Ascomycota	(D11377 Nishida et al., 1993)
	D.6a943	397nt	IC1	<i>Dunaliella parva</i> Chlorophyta	(M82988 Wilcox et al., 1992)
	D.6a943	351nt	IC1	<i>Dunaliella salina</i> Chlorophyta	(M84320 Wilcox et al., 1992)
1048	A.6a1048	394nt	IC1	<i>Arthrobiaeana stipitata</i> Chlorophyta	(X55100 Davis-Aponte et al., 1991)
	C.6a1048	428nt	IC1	<i>Chionella sarkisiana</i> Chlorophyta	(X73993 Huss, direct submission)
1199	T.6a1199	335nt	IB3	<i>Tilletiopsis fava</i> Basidiomycota	(D82819 Takashima and Nakase, 1997)
	C.6a1199	226nt	IB3	<i>Caldesia chlorophana</i> Ascomycota	(——— DeForest and Bean, 1992)
	M.6a1199	275nt	Not Analyzed	<i>Mycocalicum albonigrum</i> Ascomycota	(L37736 Gargas et al., 1993)
1508	T.6a1508	437nt	IC1	<i>Tilletiopsis fava</i> Basidiomycota	(D82819 Takashima and Nakase, 1997)
	B.6a1508	341nt	IC1	<i>Bensingtonia olivata</i> Basidiomycota	(D36233 Takashima et al., 1996)
	B.6a1508	457nt	IC1	<i>Bensingtonia yamatana</i> Basidiomycota	(D36239 Takashima et al., 1996)
	P.6a1508	390nt	IC1	<i>Protomyces anoyai</i> Ascomycota	(X12708 Sogin and Edman, 1988)
	P.6a1508	383nt	IC1	<i>Protomyces anoyai</i> Ascomycota	(D11377 Nishida et al., 1993)
	C.6a1508	441nt	IC1	<i>Chionella stipitata</i> Chlorophyta	(X5520 Huss, direct submission)
	C.6a1508	486nt	IC1	<i>Chionella nitabii</i> Chlorophyta	(X74000 Huss, direct submission)
	G.6a1508	370nt	IC1	<i>Geniculata spirotaenia</i> Chlorophyta	(X74753 Bhattacharya et al., 1994)
	M.6a1508	535nt	IC1	<i>Mugwortia aculeata</i> Chlorophyta	(X72703 Huss, direct submission)
	P.6a1508	743nt	IC1	<i>Porphyra spirotae</i> var. <i>amplifolia</i> Rhodophyta	(L26175 Oliveira and Ragan, 1994)
	H.6a1508	501nt	IC1	<i>Hildebrandia rubra</i> Rhodophyta	(L19345 Ragan et al., 1993)
1512	D.6a1512	419nt	IC1	<i>Dunaliella salina</i> Chlorophyta	(M82988 Wilcox et al., 1992)
	C.6a1512	447nt	IC1	<i>Cheaxosium saccharum</i> Chlorophyta	(M84319 Wilcox et al., 1992)
1518	C.6a1518	228nt	Not Analyzed	<i>Caldesia chlorophana</i> (grayanic acid chemotype) Ascomycota	(——— DeForest and Bean, 1992)
	C.6a1518	210nt	Not Analyzed	<i>Caldesia chlorophana</i> (merochlorophanic acid chemotype) Ascomycota	(——— DeForest and Bean, 1992)

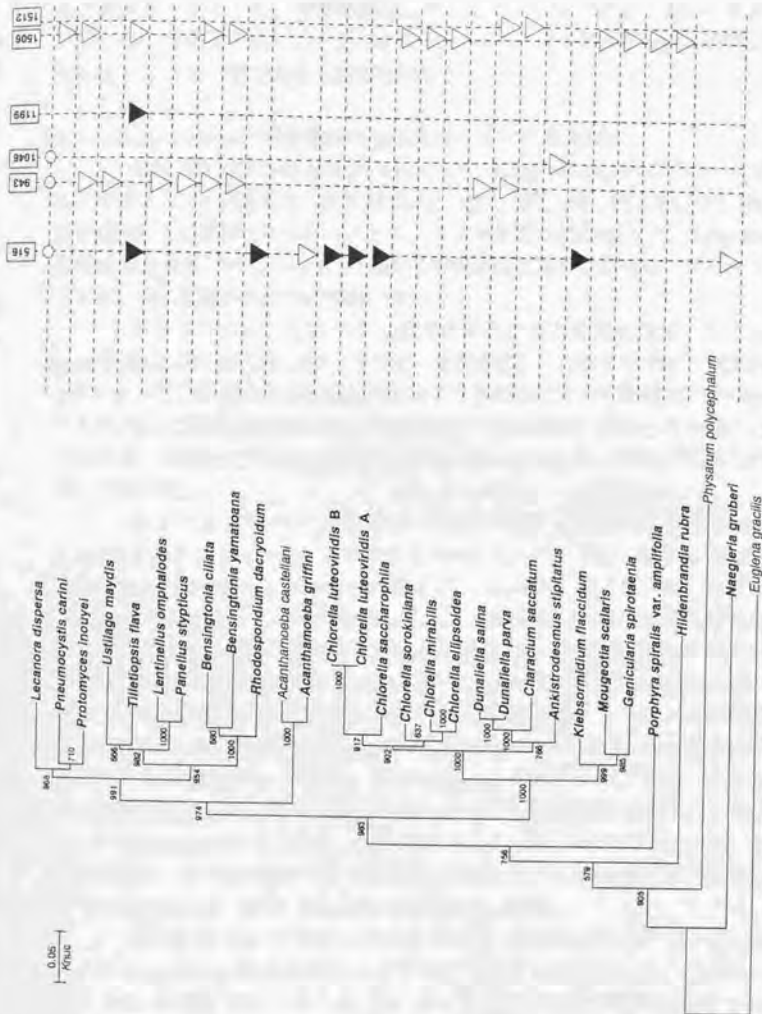


Fig. 2.6. Phylogenetic tree based on exons of 18S rDNA with the location of group I introns. The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1,454 positions, using the neighbor-joining methods (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the percentages from 1,000 replicate bootstrap sampling. Subgroup of introns: ▼ IBS, ▽ IC1, ○ not analyzed.



統的に隔たっている生物間においても、同様であった。本結果から、イントロンの挿入位置と挿入イントロンがどの subgroup に属するか、すなわちどのような二次構造をとるかは、密接に関連していることが示された。いかにいへば、イントロンの挿入位置によって、どの subgroup に属するイントロンが挿入されているか、予測可能であると推定される。

## 2.2. Group I intron の保存領域の塩基配列に基づく系統解析

Table 2.3 に示した group I intron の内、subgroup IB3 および IC1 に属するものの中から 34 を選んで、保存領域(P2, P2.1, P3, P4, P5, P6, P7, P8 および P9.0)の二次構造に基づき、アラインメントを行った(Fig. 2.7)。Subgroup IB1 に属すると報告されている *A.lent943* は本解析には加えなかった。アラインメントの後、160 塩基を系統的解析に用いた。

アラインメントに基づき、最尤法によって系統樹を作成したところ、group I intron は大きく 2 つのクラスターに分かれ、一つのクラスターは subgroup IB3 によって、また他は subgroup IC1 のイントロンによって構成された(Fig. 2.8)。これは IB3 に属するものは IC1 に属するものと系統的に異なっていることを示すもので、Michel と Westhof (1990) および Bhattacharya ら (1996) の結果と同様のものではあった。

各クラスター内の系統関係に着目すると、IB3 では、*T.flav516* は *R.dacr516* および *M.albo516* と系統枝を形成した。IC1 では、菌類の *B.cili943*、*B.yama943*、*L.omoh943*、*P.styp943* および *U.mayd943* はクラスターを形成し、*P.inou943* もこのクラスターに位置していた。緑藻類の *D.parv943* および *D.sali943* は IC1 のクラスターの、異なった系統枝に位置した。挿入位置 1506 のイントロンでは、菌類の *B.yama1506*、*P.cari1506*、*P.inou1506* および *T.flav1506* は、挿入位置 1506 の緑藻類、および挿入位置 1512 の緑藻類のイントロンと系統枝を形成した。一方、*B.cili1506* は紅藻類の *H.rubr1506* および *P.spir1506* と系統枝を形成した。この結果から、一般に、同じ subgroup のイントロンでは、エクソン部分の系統が近い種で、挿入位置が同じものはそれぞれ近縁である、と推定される。一方、*B.cili1506* のように、紅藻類の *H.rubr1506* および *P.spir1506* と系統枝を形成し、離れた系統の種の同じ挿入位置のものと類縁性を示すものもあった (Takashima et al., 1996; Takashima and Nakase, 1997)。

挿入位置 516 に報告されており IC1 に属するイントロン (*A.grif516* および *N.grub516*) は系統的には IC1 のクラスターに位置した。これは、挿入位置 516 の IC1 イントロンは IB3 のイントロンとは系統的に異なった祖先から、同じ位置に挿入されたものと推定できる。本解析においては、*Naegleria* は 1 種しか用いなかったが、De Jonckere (1994) は同じ挿入位置の group I intron が数種から見出されたことを報告している。*A.lent943* が現在、真核生物の 18S rDNA



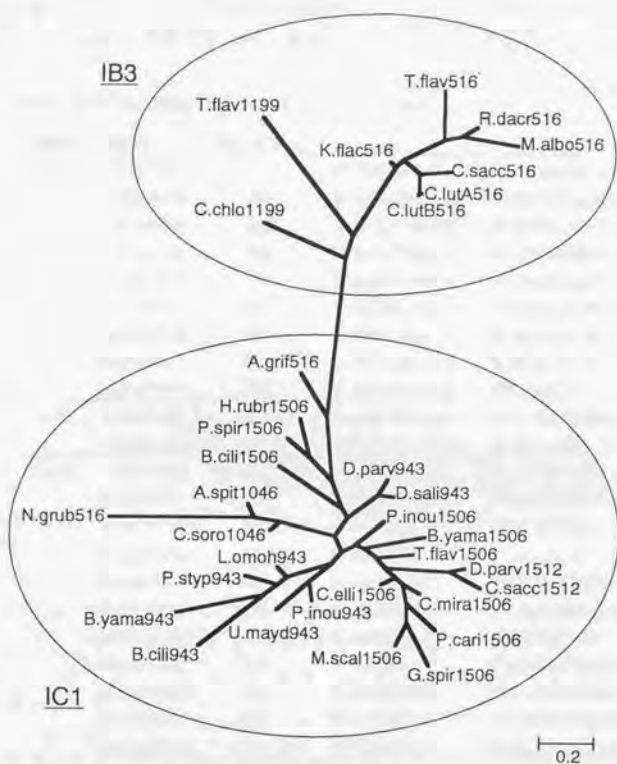


Fig. 2.8. Phylogenetic relationship of the conserved regions of group I introns found in 18S rDNA.

The tree was constructed using the maximum likelihood method in PHYLIP package ver. 3.51c (Felsenstein, 1993) based on 160 positions. For abbreviations, see Table 2.3.

に見出されている唯一の IB1 イントロンであることも考え併せて、*Naegleria* や *Acanthamoebae* といったいわゆる原生動物に見出される group I intron は、菌類や藻類から発見される同じ挿入位置のイントロンと系統的に異なっており、イントロンの伝播を考察する上で、非常に興味深いことである。

Table 2.4. Flanking regions of group I introns.

Position	Intron	Subgroup	5'	3'
516	T.flav516	IB3	5'-CUGGU-3'	5'-CAGCAGC-3'
	R.dacr516	IB3	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGCAGCCG-3'
	C.lutA516	IB3	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGCAGC-3'
	C.lutB516	IB3	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGCAGC-3'
	C.sacc516	IB3	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGCAGC-3'
	K.flac516	IB3	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGCAGC-3'
	M.albo516	IB3	5'-GUCUCU-3'	5'-AGCAG-3'
	A.grif516	IC1	5'-UCUGGU-3'	5'-AGCAG-3'
	N.grub516	IC1	5'-UCUGGU-3'	5'-CAGC-3'
	1199	T.flav1199	IB3	5'-ACAGGU-3'
C.chlo1199		IB3	5'-AACAGGU-3'	5'-CUGUGA-3'
1506	T.flav1506	IC1	5'-UAAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	B.cili1506	IC1	5'-CAAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	B.yama1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	P.cari1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUC-3'
	P.inou1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	C.elli1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	C.mira1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCG-3'
	G.spir1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	M.scal1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUA-3'
	P.spir1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUAGG-3'
	H.rubr1506	IC1	5'-AAGGU-3'	5'-UUCUGUAGG-3'

Table 2.4 は *T. flava* JCM 5186 のイントロン挿入位置、516、1199 および 1506 における flanking region について、他の group I intron と比較を行ったものである。挿入位置 1199 の 2 つのイントロン (*T. flav*1199 および *C. chlo*1199) は 5' 側は 5'-[A]ACAGGU-3' で、3' 側は 5'-CUGUGA[U]-3' であった。挿入位置 1506 では、11 のイントロンの内、5' 側はすべて同一の配列を含み (5'-AAGGU-3')、また、3' 側も *C. mira*1506 (5'-CUC-3') 以外はすべて 5'-UUC-3' で始まる共通の配列を含んでいた。*B. cili*1506、*H. rubr*1506 および *P. spir*1506 は、保存領域の配列に基づく系統樹においては同じ挿入位置の他の菌類や藻類のイントロンと離れた位置にあったが、flanking region は 5' 側および 3' 側ともに他と一致していた。挿入位置 516 においては、IB3 に属するイントロン 7 つの内

の6つ、および2つのIC1イントロンにおいて、5'側 flanking region (5'-(U)CUGGU-3')は一致していた。また、3'側はIB3およびIC1のイントロン全てにおいて、5'-CAG-3'という共通の配列を持っていた。これらのことから、5'側および3'側の両方において、flanking sequencesはそれぞれ挿入位置によって非常によく保存されていることが示された。これは、異なった挿入位置のgroup I intronはそれぞれ異なった祖先に起源するものであることを示唆するものである。

Dujun (1989)はイントロンの挿入、特に水平移動と、遺伝子の中でのイントロン自身の移動について述べている。仮に、イントロンがある位置に挿入し、その後、別の位置に移動したと仮定すると、同一の遺伝子の中では2つのイントロンの進化速度は同じであると推定される。従って、例えば、*B. ciliata*、*B. yamatoana*の2つのイントロン、および*T. flava*の2つのIB3イントロンは、配列がそれぞれ大きく異なっていることから、それぞれ別々の祖先から伝わったものと推察される。

イントロンの保存領域の塩基配列に基づく系統樹は、IB3に属するものとIC1に属するものは系統的に離れていることを示すものであった。また、MichelとWesthof (1990)が示したようにIB3とIC1では構造的に異なっている点も多い。これらは、IB3およびIC1イントロンの挿入は、18S rDNAの進化の過程で、別々に起こったことを示すものである。NishidaとSugiyama (1995)は、共生や寄生がこのイントロンの伝搬の過程に関与しているのではないかと報告している。Yamadaら (1994)はgroup I intronをもつある種のウイルスを報告している。また、最近では、group I intronは進化のある過程で特定の位置に水平移動によって挿入され、その後、その位置で他の遺伝子と共に伝わっていったという説が報告されている (Hibbett, 1996; Bhattacharya et al., 1996)。本結果もこれを支持するものであった。

以上の結果から、group I intronの系統関係は18S rDNAエクソン部分に基づく系統関係と直接は関連がないと推定される。しかし、進化の過程において18S rDNAにイントロンの挿入があった後は、その宿主である遺伝子の進化に従うと考えられる。18S rDNAにgroup I intronが報告されている種は未だ数少ないが、イントロンの挿入と欠失については、進化の過程を探る意味で重要な意義があると推察される。さらに多くのイントロンが報告されれば、イントロンの存在の分類学的意義も議論できると推察される。

#### 第四節 *Sporobolomyces* 属のITS領域と18S rDNAの塩基配列に基づく遺伝距離の比較

真核生物の18Sと26S rRNA遺伝子の間はITS領域と呼ばれ、さらに、ITS領域は5.8S rRNA遺伝子によって、2つに分断されている。18S rRNAと5.8S

rRNA 遺伝子の間の領域は ITS1、また、5.8S rRNA と 26S rRNA 遺伝子の間の領域は ITS2 と呼ばれている。これら ITS は 18S rRNA 遺伝子よりも進化の速度が早く、したがって近縁な生物間の系統を論じるのに適していると言われてきた (James et al., 1996)。James らは報告の中で、18S rDNA の差が 1.8 % の *Zygosaccharomyces* 属の場合、ITS の配列に基づく区別が可能であったと述べている。一方、Lott ら (1998) は医学的に重要な *Candida* 属の ITS2 を調べたところ、ITS2 のサイズが供試株の間で 66 - 240 bp と約 4 倍の差があったと述べている。そこで、本節では、*Sporobolomyces* 属を例として取り上げ、ITS 領域の塩基配列を決定し、18S rDNA 塩基配列に基づく遺伝距離との比較を行った。

## 1. 材料および方法

### 1.1. 供試菌株

塩基配列の決定を行った菌株は、*Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属酵母の基準株 20 株である (Table 2.5)。

Table 2.5. Yeast strains used in this study

Scientific name	JCM No.	Other designations
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	JCM 1840	=ATCC 10765 =CBS 5470 =CBS 522.50 =IFO 6903 =IMI 44158 =UCD 88-29
<i>Sporidiobolus microsporius</i>	JCM 6882	=CBS 7041
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JCM 5350	=ATCC 24260 =CBS 484 =NRRL Y-5479 =NRRL Y-17300 =VKM Y-680
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	=ATCC 20489 =ATCC 36398 =CBS 5001 =DSM 3453 =IFO 1689 =UCD 87-67
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	=ATCC 18159 =CBS 5811 =CGY 20-14-3 =IFO 1422 =NRRL Y-12938
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	JCM 1841	=CBS 490 =NRRL Y-5483 =UCD 88-371
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	JCM 5352	=ATCC 24216 =CBS 482 =IFO 10585 =NRRL Y-6683 =NRRL Y-17283 =UCD 68-329
<i>Sporobolomyces coprosmae</i>	JCM 8772	=CBS 7899
<i>Sporobolomyces elongatus</i>	JCM 5354	=ATCC 52908 =CBS 8080 =IFO 10586 =NRRL Y-17197 =NRRL Y-17282
<i>Sporobolomyces foliicola</i>	JCM 5355	=ATCC 52909 =CBS 8075 =IFO 10588 =NRRL Y-17196 =NRRL Y-17281
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	JCM 2963	=ATCC 24258 =CBS 71 =IFO 1033 =IFO 1227 =NRRL Y-15504 =UCD 68-331 =VKM Y-677
<i>Sporobolomyces griseoflavus</i>	JCM 5653	=CBS 7824 =CCRC 22265 =IFO 10589 =NRRL Y-17182 =NRRL Y-17286
<i>Sporobolomyces kluyveri</i>	JCM 6356	=CBS 7268 =IFO 10591 =NRRL Y-17211 =NRRL Y-17284
<i>Sporobolomyces oryzae</i>	JCM 5299	=CBS 7228 =IFO 10180
<i>Sporobolomyces phyllomati</i>	JCM 7549	=CBS 7198
<i>Sporobolomyces roseus</i>	JCM 5353	=CBS 436
<i>Sporobolomyces sasicola</i>	JCM 5979	=CBS 7285 =CCRC 22262 =IFO 10593 =NRRL Y-17183
<i>Sporobolomyces singularis</i>	JCM 5356	=ATCC 24193 =CBS 5109 =DSM 70871 =IFO 10594 =NCYC 900 =NRRL Y-5852 =UCD 60-79
<i>Sporobolomyces tsugae</i>	JCM 2960	=ATCC 18802 =CBS 5038 =CCRC 22373 =DSM 70746 =IFO 10595 =NRRL Y-5849 =UCD 60-71
<i>Sporobolomyces xanthus</i>	JCM 6885	=CBS 7513

### 1.2. 塩基配列の決定方法と遺伝距離の比較

塩基配列の決定には、方法 c) を用い、プライマーは Table 2.2 の ITS 用プ

ライマーを用いた。アラインメントは上述したように、CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) ver. 1.7 を用いて行い、目視で修正した。各塩基配列間の遺伝距離は Kimura (1980) の方法により、18S rDNA の場合はギャップの部分を除いて、また、ITS 領域の場合はギャップを含めて算出した。

## 2. 結果と考察

決定した ITS1 および ITS2 のサイズは供試株によって異なっており、Fig. 2.3 に示したサビキン綱菌類の同一サブクラスターの中でも、40 bp 以上の差が認められるものもあった (Table 2.6)。また、サイズが類似していても、サブクラスターの異なった菌株間では挿入および欠損の部位が多く、アラインメントは困難であった。そこで、アラインメントはサブクラスター毎に行った。

Table 2.6. Size variety of ITS regions among *Sporidiobolus*-*Sporobolomyces* species

Subcluster*	Scientific name	JCM No.	ITS1 (bp)	ITS2 (bp)
2a	<i>Sporobolomyces sasicola</i>	JCM 5979	141	206
	<i>Sporobolomyces xanthus</i>	JCM 6885	139	196
	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	JCM 1840	147	209
	<i>Sporidiobolus microsporus</i>	JCM 6882	152	210
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JCM 5350	146	207
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	149	211
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	149	211
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	JCM 1841	152	216
	<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	JCM 5352	152	219
	<i>Sporobolomyces griseoflavus</i>	JCM 5653	189	237
2b	<i>Sporobolomyces roseus</i>	JCM 5353	151	208
	<i>Sporobolomyces singularis</i>	JCM 5356	178	211
	<i>Sporobolomyces tsugae</i>	JCM 2960	183	239
	<i>Sporobolomyces coprosmae</i>	JCM 8772	144	208
	<i>Sporobolomyces elongatus</i>	JCM 5354	145	240
	<i>Sporobolomyces foliicola</i>	JCM 5355	139	211
	<i>Sporobolomyces gracilis</i>	JCM 2963	143	212
	<i>Sporobolomyces kluveriniellii</i>	JCM 6356	151	218
	<i>Sporobolomyces oryzicola</i>	JCM 5299	143	209
	<i>Sporobolomyces phyllomatis</i>	JCM 7549	148	207
2c				

\*. See Fig. 2.3

サブクラスター2bに位置する *Sporobolomyces* 属酵母 11 種のうち、ITS1 のサイズが大きかった *S. griseoflavus*, *S. singularis* および *S. tsugae* の 3 株を除いた 8 種について、アラインメントを行った。比較した ITS1 のサイズは 146 - 152bp、ITS2 は 207 - 219 bp である。アラインメントの後 (Fig. 2.9)、塩基配列間の遺伝距離を算出し、18S rDNA におけるの遺伝距離と比較した (Table 2.7)。Fig. 2.9 に示したように、これら 8 株は 3 グループに分けられた。すなわち、1) *S. alborubescens*、2) *Sporid. ruineniae* var. *ruineniae*、*S. ruineniae* var. *coprophilus* および *S. microsporus*、および 3) *Sporid. johnsonii*、*Sporid. salmonicolor*、*Sporid.*

[ITS1]

S.ruru.1839 GTGATAA-TAGGACGTTCCATTAACTGGAGTCCGAAC--TCTCACTTCTTAACCCGT  
S.ruco.8097 .....T.....  
S.micr.6882 .....TTA.....A.....T.....  
S.albo.5352 .....C.A.C.....T.G.....  
S.rose.5353 .....A.....GT.....C.A.....T.G.AC.....CT.....  
S.para.5350 T.....A.CA.....GT.....C.A.....T.G.AC.....A.....T.....A.....TT.....  
S.salm.1841 .....AC.....GT.....C.A.....T.G.GC.....A.....CT.....  
S.john.1840 .....T.A.....GT.....C.A.....T.G.GC.....CT.....

S.ruru.1839 TGCATTGTTTTGGCTAGTAG-GATGOTT--GGGTCCGAGACGCTCTTCATTACAAGA  
S.ruco.8097 .....CG.....  
S.micr.6882 .....T.....CG.....  
S.albo.5352 .....C.....G.....A.....A-CTCT.GCAA.A.AG.....T.....A.....C.....T.....  
S.rose.5353 .....C.....A.....AA.G.CGA-CAAT,TC.A.T-TGAG,AT.....C.....TAT,AG  
S.para.5350 .....C.....A.....AA.G.CGA-CAA.....C.....T-TGAG.....C.....AG  
S.salm.1841 .....C.....A.CTACG.....GA.....C.....C.T.G.....G.....CGAG.....C.....TA.....  
S.john.1840 .....C.....A.CTAA.G.....GAA.....C.....T.....A.....CGAG.....C.....

S.ruru.1839 CAAAGTCTATGATGT-TTAA-TTTTATACAAAAACA-  
S.ruco.8097 .....  
S.micr.6882 .....A.....T.....  
S.albo.5352 .....A.....A.....T.....  
S.rose.5353 ACT.....A-A.....T.....T.A  
S.para.5350 ACT.....A-A.....T.....T.A  
S.salm.1841 .C.....A.....TAA.....C.....T.T.T.A  
S.john.1840 .CG.....A.....A.....TAA.....C.....T.T.T.A

[ITS2]

S.ruru.1839 GAATTCCTCAACCCCTCTCTTTCTTAGTGATASAGAGGCTGGATTCTGAGCTGTGC  
S.ruco.8097 .....A.C.....T.T.....  
S.micr.6882 .....A.....CTC.....A.....GA.....T.T.....C.C.....  
S.albo.5352 .....AACTG.....A.AC.....CTG.....T.T.....C.C.....  
S.rose.5353 .....AA.....A.....CGATTG.....T.T.....C.C.....  
S.para.5350 .....CAC.G.....CA.ACGCGTG.....T.....C.C.....  
S.salm.1841 .....CA.....G.....A.ACGTTG.....T.....C.C.....  
S.john.1840 .....CA.....G.....A.ACGTTG.....T.....C.C.....

S.ruru.1839 T--CC-ITACCCG--AGCTCATTGGTAATACATTAGCATCGATATCGAATTCTGGGATT  
S.ruco.8097 .....T.....  
S.micr.6882 .....A.....GT.....  
S.albo.5352 .GG.....GOTCT.....G.....GC.A.....  
S.rose.5353 .GG.....CGTG.C.T.....G.....C.....A.A.C.....  
S.para.5350 .GG.S.....TG.C.T.....G.....C.....A.AC.....G.....  
S.salm.1841 .GG.....C-GG.C-T.....G.....G.....CG.....GAC.....G.....  
S.john.1840 .GA.....AT.....T.....G.....G.....CG.....GAC.....G.....

S.ruru.1839 GACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAAT-CTAA--CTTCGG--TTAGAGCGGGT  
S.ruco.8097 .....  
S.micr.6882 .....C.....T.....C.....T.....  
S.albo.5352 .....A.....GT.....A.....  
S.rose.5353 .....A.....D.A.T--G.....G.....A.....AAG.....  
S.para.5350 .....A.....T.GGT--GGAAAC--A.C.....AAG.....  
S.salm.1841 .....G.AAGTGGC.....GTTACT.....AAG.....  
S.john.1840 .....G.AAGTGGTC,CC--ACT.....AAG.....

S.ruru.1839 TT-GAAGTAGGAAGCTCCTAATCTAGCTTAGCTAC-TTTTA-GA  
S.ruco.8097 .....A.....  
S.micr.6882 .....A.....A.....C.....  
S.albo.5352 .GG.TTAA.....T.....AA.....A.....A.....  
S.rose.5353 ..-A.TTAT.....T.....TG--AAA.....C.....  
S.para.5350 ..-C.TTA.....T.....AAA.....C.....  
S.salm.1841 C--TTTC.....T.....C.CCT-AAA.....C.....  
S.john.1840 C--TTTC.....T.....CCC-AAA.....C.....

Fig. 2.9. Alignment of ITS1 and ITS2 sequences among *Sporobolomyces* spp. in subgroup 2b. Abbreviations: S.albo.5352, *S. alborubescens* ICM 5352; S.ruru.1839, *Sporid. ruineniae* var. *ruineniae* ICM 1839; S.ruco.8097, *Sporid. ruineniae* var. *coprophilus* ICM 8097; S.micr.6882, *Sporid. microsporus* ICM 6882; S.john.1840, *Sporid. johnsonii* ICM 1840; S.salm.1841, *Sporid. salmonecolor* ICM 1841; S.para.5350, *Sporid. paroveus* ICM 5350; S.rose.5353, *S. roseus* ICM 5353.



*pararoseus* および *S. roseus* である。これらのグループ内の 18S rDNA 塩基配列間の遺伝距離はいずれも 0.01 Knuc 以下で、系統樹上ではそれぞれクラスターを形成していた (Fig. 2.3)。また、ITS2 よりも ITS1 の方がそれぞれのグループを識別する塩基置換が多く認められた。

Table 2.7. Distance matrix of 18S rDNA and ITS1/ITS2 sequences among *Sporidiobolus*-*Sporobolomyces* spp. in subgroup 2b\*

18S rDNA vs. ITS1		<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	<i>Sporid. microsporus</i>	<i>Sp. alborubescens</i>	<i>Sp. roseus</i>	<i>Sporid. pararoseus</i>	<i>Sporid. salmonicolor</i>	<i>Sporid. johnsonii</i>	<i>Sp. tsugae</i>	<i>Sp. singularis</i>	<i>Sp. griseoflavus</i>
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	0.000	0.034	0.155	0.287	0.286	0.257	0.236					
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	0.003	0.034	0.155	0.287	0.286	0.257	0.236					
<i>Sporid. microsporus</i>	JCM 8882	0.008	0.002		0.153	0.295	0.280	0.259	0.225				
<i>Sp. alborubescens</i>	JCM 5352	0.021	0.019	0.023		0.295	0.289	0.259	0.246				
<i>Sp. roseus</i>	JCM 5353	0.028	0.027	0.027	0.030		0.083	0.162	0.153				
<i>Sporid. pararoseus</i>	JCM 5350	0.028	0.027	0.027	0.030	0.002		0.179	0.179				
<i>Sporid. salmonicolor</i>	JCM 1841	0.020	0.018	0.021	0.021	0.011	0.011		0.068				
<i>Sporid. johnsonii</i>	JCM 1840	0.020	0.019	0.021	0.022	0.019	0.019	0.001					
<i>Sp. tsugae</i>	JCM 2960	0.036	0.035	0.029	0.040	0.028	0.028	0.028	0.018				
<i>Sp. singularis</i>	JCM 5356	0.035	0.034	0.034	0.039	0.031	0.031	0.029	0.029	0.021			
<i>Sp. griseoflavus</i>	JCM 5653	0.035	0.034	0.034	0.040	0.035	0.035	0.029	0.029	0.031	0.028		

18S rDNA vs. ITS2		<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	<i>Sporid. microsporus</i>	<i>Sp. alborubescens</i>	<i>Sp. roseus</i>	<i>Sporid. pararoseus</i>	<i>Sporid. salmonicolor</i>	<i>Sporid. johnsonii</i>	<i>Sp. tsugae</i>	<i>Sp. singularis</i>	<i>Sp. griseoflavus</i>
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	0.005	0.062	0.159	0.233	0.219	0.249	0.244					
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	0.003	0.057	0.146	0.238	0.224	0.254	0.249					
<i>Sporid. microsporus</i>	JCM 8882	0.008	0.002		0.159	0.228	0.230	0.235	0.235				
<i>Sp. alborubescens</i>	JCM 5352	0.021	0.019	0.013		0.215	0.230	0.229	0.244				
<i>Sp. roseus</i>	JCM 5353	0.028	0.027	0.027	0.030		0.068	0.150	0.157				
<i>Sporid. pararoseus</i>	JCM 5350	0.028	0.027	0.027	0.030	0.002		0.175	0.149				
<i>Sporid. salmonicolor</i>	JCM 1841	0.020	0.018	0.021	0.021	0.011	0.011		0.067				
<i>Sporid. johnsonii</i>	JCM 1840	0.020	0.019	0.021	0.022	0.019	0.019	0.001					
<i>Sp. tsugae</i>	JCM 2960	0.036	0.035	0.029	0.040	0.028	0.028	0.028	0.018				
<i>Sp. singularis</i>	JCM 5356	0.035	0.034	0.034	0.039	0.031	0.031	0.029	0.029	0.021			
<i>Sp. griseoflavus</i>	JCM 5653	0.035	0.034	0.034	0.040	0.035	0.035	0.029	0.029	0.031	0.028		

\*Upper triangle, distance for ITS sequences. Bottom triangle, distance for 18S rDNA sequences.

サブクラスター-2c の 7 株についても同様にアラインメントを行った (Fig. 2.10)。比較した ITS1 のサイズは 139 - 151 bp, ITS2 は 207 - 240 bp である。これら菌株間の 18S rDNA 塩基配列の遺伝距離はいずれも 0.03 Knuc 以下であったが、*S. elongatus* の ITS2 のサイズは 240 bp で他の菌株より約 30 bp 大きかった。アラインメントの結果から、3 箇所に塩基の挿入があるものの、二次構造は 2c の他の菌株と類似していると推定された。各菌株間の塩基配列の遺伝距離を算出し、18S rDNA の類似度と比較したところ、*S. oryzzicola* と *S. coprosmae* は ITS1 の配列は 1 塩基の挿入部分が異なっているだけであった (Table 2.8)。この 2 株間の DNA 相同性は 45 - 48 % であると報告されている (Hamamoto and Nakase, 1995)。

[ITS1]

S.oryz.5299 ATGAAATTC AAGGACGCTCTTTT TAGAGGTCGGACCAATTAGATTT-ACGTT--TACTCT  
S.copr.8772 .....A.....T.....  
S.foli.5355 .....GT.....A.A.....T.....  
S.glac.2963 .....G.....C.AAT.....T.....A.....  
S.kluy.6356 .....T.GT.....C.AAT.....T.....TC.....A.....  
S.phyl.7549 .....G.....T.....A.....ACT.....TC.....A.....  
S.elon.5354 .....T.....T.....A.....AT.....T.....A.....A.....

S.oryz.5299 GTCACAC-ACTACTCTTT---ACACC--ATTITT--TAACTC-TATAGT-TTTAAGAAT  
S.copr.8772 .....T.....TAT.....ATC.....  
S.foli.5355 .....T.....T.....TCT.....T.....G.-AT.....C.....  
S.glac.2963 .....TT.....T.....T-T.....CC.....AT.....A.-AT.....A.....  
S.kluy.6356 .....T.....T.....T-T.....CA.....A.TAT.....AA.....  
S.phyl.7549 .....A.T.....T-T.....C.....AA.....A.-A.A.....C.A.....  
S.elon.5354 .....A.T.....T-T.....C.....AA.....A.-A.A.....C.A.....

S.oryz.5299 GTAAACCAAGTCTCGAAA--GAGCAACATAACAAACA  
S.copr.8772 .....T.A..T...T.....  
S.foli.5355 .....TC.....T.A.GT...T.....  
S.glac.2963 .....T.....TT.GTT...TA.A.T...T.....  
S.kluy.6356 .....T.....TT..TT...TA.A.T...T.....  
S.phyl.7549 .....TT..TT...TA.AGTT.T..T.....  
S.elon.5354 .....TT..TT...TA.AGTT.T..T.....

[ITS2]

S.oryz.5299 GAAACTCTCAACCCCCCTCATTTTGTAATGAAGTGAGT-CGTGGGCTTGGG-TTATGGCT  
S.copr.8772 .....C-T.....T.....  
S.foli.5355 .....AC.....A..G.....  
S.glac.2963 .....G.....CAG.C-T.....T.....T.....  
S.kluy.6356 .....A.AG.C-T.C.....T.....  
S.phyl.7549 .....G.....GACAG.CGTT.....  
S.elon.5354 .....G.....GACAG.CGTT.....

S.oryz.5299 GTCGTGGG-----CTTAAGTG-----CCGGCTCAGCTGAAATACAAGA  
S.copr.8772 .....C.T.....C.....  
S.foli.5355 .....CT.....C.....C.....  
S.glac.2963 .....G..A.....TG.....  
S.kluy.6356 .....CA.....T.....A.....T.....  
S.phyl.7549 .....T.....CA.....A.....C.....  
S.elon.5354 .....CT..CT..TCAGAGAAC...CTAGTTTCGAGTTA.....G.....C.....

S.oryz.5299 GTAACCCCAAGTTGAAAATCTGACCGCTGACTCGGCGTAATAAT-TATTATCGCTGAGG  
S.copr.8772 .....A.....T.CT.....T.....  
S.foli.5355 .....C.....T.C.A.....C.....  
S.glac.2963 .....CT...ATT.A.TTG..ATAAG...T.....T.....C.....  
S.kluy.6356 .....CT...TA..TT..ATA...T.....T.....  
S.phyl.7549 .....C.....T..TA.....G.....  
S.elon.5354 .....C.....T..TA.....G.....

S.oryz.5299 ACGTCTAGCCTCAAATCGT---TAGTGGTCTTCTAATGCAAA-----  
S.copr.8772 .....A.....TICAT-----CTA.....  
S.foli.5355 .....A.T.....TICAT-----CTA.....  
S.glac.2963 .....C.T.....TTT-----ATA.....  
S.kluy.6356 .....CT..TATTGCA..C.TA.TAA.....T.GTTTAAAT-----AAA.....  
S.phyl.7549 .....ACATT..T...TR--ACA.....T.....  
S.elon.5354 .....T.CATA.CA.G-----A.....G.GTGTAAACAGCACTT

S.oryz.5299 TCATTTAAGAT  
S.copr.8772 .....  
S.foli.5355 GAC.A...C.  
S.glac.2963 AT.A...C.  
S.kluy.6356 CT.C...C.  
S.phyl.7549 .A.C...C.  
S.elon.5354 CT.CC...TAC.

Fig. 2.10. Alignment of ITS1 and ITS2 sequences among *Sporobolomyces* spp. in subgroup 2c. Abbreviations: S.oryz.5299, *S.oryzicola* ICM 5299; S.copr.8772, *S.coprosmae* ICM 8772; S.foli.5355, *S.folicola* ICM 5355; S.glac.2963, *S.glacilis* ICM 2963; S.kluy.6356, *S.kluyverianii* ICM 6356; S.phyl.7549, *S.phyllomatis* ICM 7549; S.elon.5354, *S.elongatus* ICM 5354.

Table 2.8 Distance matrix of 18S rDNA and ITS1/ITS2 sequences among *Sporobolomyces* spp. in subgroup 2c\*

18S rDNA vs. ITS1		<i>S. oryzicola</i>	<i>S. coprosmae</i>	<i>S. follicola</i>	<i>S. gracilis</i>	<i>S. kluyverinii</i>	<i>S. phyllomatis</i>	<i>S. elongatus</i>
<i>S. oryzicola</i>	JCM 5299		0.000	0.100	0.151	0.171	0.151	0.167
<i>S. coprosmae</i>	JCM 8772	0.008		0.100	0.151	0.171	0.151	0.167
<i>S. follicola</i>	JCM 5355	0.013	0.013		0.088	0.116	0.124	0.169
<i>S. gracilis</i>	JCM 2963	0.024	0.027	0.021		0.094	0.115	0.147
<i>S. kluyverinii</i>	JCM 6356	0.028	0.028	0.021	0.011		0.074	0.141
<i>S. phyllomatis</i>	JCM 7549	0.024	0.027	0.021	0.003	0.010		0.106
<i>S. elongatus</i>	JCM 5354	0.023	0.027	0.019	0.019	0.020	0.020	

18S rDNA vs. ITS2		<i>S. oryzicola</i>	<i>S. coprosmae</i>	<i>S. follicola</i>	<i>S. gracilis</i>	<i>S. kluyverinii</i>	<i>S. phyllomatis</i>	<i>S. elongatus</i>
<i>S. oryzicola</i>	JCM 5299		0.019	0.102	0.097	0.237	0.163	0.189
<i>S. coprosmae</i>	JCM 8772	0.008		0.102	0.102	0.229	0.159	0.196
<i>S. follicola</i>	JCM 5355	0.013	0.013		0.120	0.220	0.154	0.172
<i>S. gracilis</i>	JCM 2963	0.024	0.027	0.021		0.224	0.182	0.196
<i>S. kluyverinii</i>	JCM 6356	0.028	0.028	0.021	0.011		0.155	0.234
<i>S. phyllomatis</i>	JCM 7549	0.024	0.027	0.021	0.003	0.010		0.179
<i>S. elongatus</i>	JCM 5354	0.023	0.027	0.019	0.019	0.020	0.020	

\*Upper triangle, distance for ITS sequences; Bottom triangle, distance for 18S rDNA sequences.

ITS1 の配列もこの 2 株が極めて近縁であることを示した。

以上のサブクラスター 2b および 2c の *Sporobolomyces* 酵母の 18S rDNA と ITS 領域の塩基配列間の遺伝距離の比較から、18S rDNA の遺伝距離が 0.01 K<sub>nuc</sub> 以下の菌株間では、ITS1 および ITS2 共に 0.1 K<sub>nuc</sub> 以下の類似度を示すと推定された。一方、18S rDNA の類似度が 0.03 K<sub>nuc</sub> の菌株間では、ITS2 の類似度は、0.25 K<sub>nuc</sub> 以下を示したが、ITS1 では 0.25 K<sub>nuc</sub> 以上を示す場合もあった。本結果より、ITS1 の方が ITS2 より進化速度が速いと推察された。

かつて、ITS は機能を持たない介在配列であるため、進化の速度が早いとされていた。しかし、近年になって、ITS2 は rRNA のプロセッシング過程において役割を果たしているという報告もされている (Musters et al., 1990; Sande et al., 1992)。本実験で、18S rDNA 塩基配列間の遺伝距離が 0.03 K<sub>nuc</sub> の場合、ITS2 の塩基配列の類似度は 0.25 K<sub>nuc</sub> であったが、アラインメントを見ると、保存領域部分はよく保存されている。これは、ITS2 が 18S rRNA と同様、構造体とし

て機能していることを支持するものである。従って、18S rDNA 塩基配列間の遺伝距離 0.03 Knuc 程度の近縁な菌株間の系統を比較する場合には、ITS2 は有効であろうと思われる。しかし、*S. elongatus* の場合のように、特異的な挿入がある場合も推定されるので、アラインメントの際には十分な注意が必要である。一方、ITS1 の場合、18S rDNA 塩基配列間の遺伝距離が 0.03 Knuc の時、約 1/3 が異なっており、保存領域も ITS2 に比べると少ない。従って、ITS1 はさらに近縁 (0.01 Knuc 程度) の菌株間の比較に用いるのが適当であると思われる。

### 第三章 担子菌系酵母の細胞壁糖組成とその系統分類学的意義

#### 第一節 緒言

担子菌類の細胞壁は *N*-アセチルグルコサミン(*N*-acetylglucosamine)のポリマーであるキチン(chitin)を骨格とし、これにグルカン(glucan)またはマンナン(mannan)などが結合して構成されている。Bartnicki-Garcia (1968)は、菌類は細胞壁多糖の組成に基づき、大きく 8 つのカテゴリーにわけられると述べた (Table 3.1)。このグルーピングの中で、担子菌類はカテゴリー V の Chitin-glucan (Homobasidiomycetes)およびカテゴリー VII の Mannan-chitin (Heterobasidiomycetes)の 2 つに属する。それ以来、酵母も含めた菌類の中で、菌体糖組成は重要な分類指標といわれてきた。担子菌系酵母においても、多くの研究者たちが全菌体加水分解物中の糖組成を報告している (Sugiyama et al., 1985; Suzuki and Nakase, 1988; Weijman and Golubev, 1987; Weijman and Rodrigues de Miranda, 1983, 1988a)。とりわけ、細胞壁に局在するといわれているキシロースの有無は、現在では、担子菌系酵母の属レベルでの分類指標として用いられている (Suzuki and Nakase, 1988; Weijman et al. 1988b)。18S rDNA 塩基配列に基づく系統学的な解析からも、菌体中のキシロースの有無は系統をよく反映しており、分類指標としての信頼性が評価されている。

Table 3.1. Cell wall category of fungi

Chemical category	Taxonomic group
I Cellulose-glycogen	Acrasiales
II Cellulose-glucan	Oomycetes
III Cellulose-chitin	Hyphochytridiomycetes
IV Chitosan-chitin	Zygomycetes
V Chitin-glucan	Chytridiomycetes Ascomycetes Basidiomycetes Deuteromycetes
VI Mannan-glucan	Saccharomycetaceae Cryptococcaceae
VII Mannan-chitin	Sporobolomycetaceae Rhodotorulaceae
VIII Polygalactosamine-galactan	Trichomycetes

(Bartnicki-Garcia, 1968)

しかしながら、従来の全菌体加水分解法は、細胞壁の構成糖を定性的に分析することは可能であるが、定量的な評価を行うことはできなかった。全菌体

の加水分解物中には、細胞壁のほかに、菌体内の貯蔵糖、中間代謝物などに由来するものも含まれており、また、培養日数などの条件により、糖組成が変化することが推定されるからである。Prillingerらは広範な範囲の子囊菌類および担子菌類の細胞壁を調製し、その細胞壁中性糖の組成を決定した (Prillinger et al., 1990, 1991a, 1991b, 1993)。彼らの結果から、担子菌類は細胞壁糖組成により、大きく3つに区分されることが明らかとなった。また、この細胞壁糖組成による3つのグループは18S rDNAの塩基配列に基づく担子菌類の大きな3つのクラスターと一致していた。

この事実は、SwannとTaylor (1993)が担子菌類の3つの綱、菌蕈綱、サビキン綱およびクロボキン綱の定義の修正を行う際の有力な根拠の一つであった。各綱の細胞壁糖組成の特徴は、サビキン綱の菌類の細胞壁の主要構成糖はマンノースであるのに対して、クロボキン綱および菌蕈綱の場合はグルコースである。さらにクロボキン綱および菌蕈綱は細胞壁中のキシロースの存在によって区別される。形態の分化が乏しい酵母においては、彼らが担子菌類の3つの綱の定義の修正に採用した諸性質の中で、細胞壁の糖組成は容易に結果が得られやすく、また比較しやすい性質である。

Prillingerらの行った研究は広範囲の菌類を対象としたため、担子菌類については一部の菌群のデータがあるのみで、全体にわたって、詳しく調べられているわけではない。そこで、担子菌類の系統を反映する新たな表現形質の探索の一つとして、細胞壁中性糖の組成を取り上げ、主要構成糖と同時に副構成成分としての糖にも注目した。

射出胞子形成酵母の属の分類は、現在、第一章のTable 1.6に示したように、形態的な特徴と菌体中のキシロースの有無および主要ユビキノンによって行われている。この中で、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属は、両属とも菌体にキシロースを含まず、主要ユビキノンはQ-10で、従来は、射出胞子の形など形態的な特徴によって区別されてきた。従って、形態的な特徴は不安定であることも多いことから、両属の区別は曖昧であった。しかしながら、第二章で述べたとおり、系統的には *Tilletiopsis* 属がクロボキン綱に位置するのに対して、*Sporobolomyces* 属はサビキン綱に位置することから、細胞壁の主要構成糖によって区別可能であることが推定される。従って、研究を行うに当たっては、いわゆる射出胞子形成酵母だけでなく、yeast-like fungi といわれてきた *Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria* 属、また射出胞子を形成しない種も加え、担子菌類全体としての分類学および系統学的な考察を行った。

## 第二節 18S rDNA 塩基配列に基づく担子菌類の系統と細胞壁糖組成

### 1. 材料および方法

### 1.1. 供試菌株

*Bensingtonia* 属, *Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属, *Rhodotorula* 属, *Symptodiomyces* 属, *Tilletiopsis* 属など, 射出胞子形成酵母および関連担子菌系酵母 50 種の基準株を供試菌として用いた (Table 3.2)。供試菌は 250 ml の YM broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む 500 ml 三角フラスコ中で, ロータリーシェーカーを用いて 25°C で培養し, 定常期に集菌した。菌体は脱イオン水でよく洗浄し, 使用するまで -20°C で保存した。

### 1.2. 細胞壁の調製法

すべての操作は氷上にて行った。菌体を 5 mM EDTA を含む 1/15 M リン酸バッファー (pH 7.2) に懸濁し, Braun cell homogenizer (B. Braun, Melsungen, Germany) を用いて 4,000 rpm で処理し, 顕微鏡下で未破碎の細胞がなくなるまで破碎した。破碎された細胞はガラスビーズを除くため 1000 rpm で 10 分間遠心後, その上清を 10,000 rpm で 20 分間遠心した。沈殿物を脱イオン水に懸濁し, 同じ操作を 3 回繰り返した。脱イオン水を用いてよく洗浄した沈殿を再び脱イオン水に懸濁し, 60% (w/v) シュクロース溶液 15 ml の上に重層して 15,000 rpm, 1 時間遠心した (Hartland et al. 1994)。沈殿物を脱イオン水を用いて少なくとも 3 回洗浄した後, アセトンで洗浄し乾燥した。得られた細胞壁画分は正確には細胞膜や夾膜成分を含んでいると考えられるが, 本実験においてはこれを細胞壁として扱った。

### 1.3. 細胞壁の加水分解

細胞壁の加水分解は Suzuki と Nakase (1988) の方法を用いて行った。細胞壁 10 mg を 2 M トリフルオロ酢酸溶液 (TFA) 2 ml に懸濁し, メタルブロックバスを用いて, 100°C 3 時間加水分解を行った。室温になるまで放置した後, 未分解の残渣を, ろ過によって取り除いた。TFA はロータリーエバポレーターを用いて脱イオン水で数回洗浄して除いた。

### 1.4. 細胞壁中性糖の分析

加水分解された中性糖は Kiho ら (1986) の方法により, アルジトール・酢酸化した。加水分解物を 200  $\mu$ l の脱イオン水に懸濁し, 濃アンモニア水を一滴加えてアルカリ性にした後, 水素化ホウ素ナトリウムを 30 mg 加え, 室温に一晩放置して, 糖をアルジトールに還元した。これに, Amberlite IR 120 (H+) を加えて中和し, 濾過して Amberlite を除いた後, メタノールとエバポレーターを用いて水素化ホウ素ナトリウムを洗浄して除いた。洗浄後, 反応物に無水酢酸/ピリジン (acetic anhydride/pyridine 1:1, v/v) 1 ml を加えて, 室温で一晩反応させた。

Table 3.2. Yeast strains used for carbohydrate analyses of cell wall

Scientific name	Other designations	DDBJ/EMBL/GenBank accession No.
Genus <i>Bensingtonia</i>		
<i>B. ciliata</i>	JCM 6865 =CBS 7514 =IFO 10577	D38233
<i>B. ingoldii</i>	JCM 7445 =CBS 7424 =IFO 10578	D38234
<i>B. intermedia</i>	JCM 5291 =ATCC 66425 =BKM Y-2720 =CBS 7226 =IFO 10178 =KCTC 7207	D38235
<i>B. miscanthi</i>	JCM 5733 =CBS 7282 =IFO 10579	D38236
<i>B. musae</i>	JCM 8801 =CBS 7965	D43946
<i>B. naganensis</i>	JCM 5978 =CBS 7286 =IFO 10580	D38366
<i>B. phylladus</i>	JCM 7476 =CBS 7169 =IFO 10581	D38237
<i>B. sakaguchii</i>	JCM 10047	AB001746
<i>B. subrosea</i>	JCM 5735 =CBS 7283 =IFO 10582	D38238
<i>B. yamatoana</i>	JCM 2896 =CBS 7243 =IFO 10583 =NRRL Y-17308	D38239
<i>B. yuccicola</i>	JCM 6251 =CBS 7331 =NRRL Y-17310	D38367
Genus <i>Erythrobasidium</i>		
<i>E. hasegawianum</i>	JCM 1545 =ATCC 9536 =CCY 20-9-3 =IAM 12911 =IFO 1058	D12803
Genus <i>Rhodotolura</i>		
<i>R. aurantiaca</i>	JCM 3771 =CBS 317 =IFO 0754 =NRRL Y-1518	this study
<i>R. musilaginoso</i>	JCM 8115 =CBS 316 =IAM 12988 =IFO 0890 =MUCL 30403 =NCTC 2622 =NCYC 63 =VKM Y-339	
<i>R. lactosa</i>	JCM 1546 =ATCC 18176 =CBS 5826 =IFO 1423 =UCD 67-62	D45366
<i>R. minuta</i>	JCM 3777 =ATCC 10658 =CBS 319 =IFO 0387 =NRRL Y-1589	D45367
Genus <i>Sakaguchia</i>		
<i>S. dacryoidea</i>	JCM 3795 =ATCC 24502 =CBS 6353 =DSM 4638 =IFO 1930 =MUCL 30319	D13459
Genus <i>Sporidiobolus</i>		
<i>Sporid. johnsonii</i>	JCM 1840 =ATCC 10765 =CBS 5470 =CBS 522.50 =IFO 6903 =IMI 44158 =UCD 68-29	L22261
<i>Sporid. pararoseus</i>	JCM 5350 =ATCC 24260 =CBS 484 =NRRL Y-5479 =NRRL Y-17300 =VKM Y-680	
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839 =ATCC 20489 =ATCC 36398 =CBS 5001 =DSM 3453 =IFO 1689 =UCD 67-67	
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097 =ATCC 16159 =CBS 5811 =CCY 20-14-3 =IFO 1422 =NRRL Y-12938	
<i>Sporid. salmonicolor</i>	JCM 1841 =CBS 490 =NRRL Y-5483 =UCD 68-371	
Genus <i>Sporobolomyces</i>		
<i>Sp. alborubescens</i>	JCM 5352 =ATCC 24216 =CBS 482 =IFO 10585 =NRRL Y-6683 =NRRL Y-17283 =UCD 68-329	
<i>Sp. coprosmae</i>	JCM 8772 =CBS 7899	
<i>Sp. coprosmicola</i>	JCM 8767 =CBS 7897	
<i>Sp. dimmenae</i>	JCM 8762 =CBS 7896	
<i>Sp. dracophyllus</i>	JCM 8773 =CBS 7900	
<i>Sp. elongatus</i>	JCM 5354 =ATCC 52908 =CBS 8080 =IFO 10588 =NRRL Y-17197 =NRRL Y-17282	
<i>Sp. falcatus</i>	JCM 6838 =ATCC 64693 =CBS 7368 =IFO 10587	
<i>Sp. foliicola</i>	JCM 5355 =ATCC 52909 =CBS 8075 =IFO 10586 =NRRL Y-17196 =NRRL Y-17281	
<i>Sp. gracilis</i>	JCM 2963 =ATCC 24258 =CBS 71 =IFO 1033 =IFO 1227 =NRRL Y-15504 =UCD 68-331 =VKM Y-677	
<i>Sp. griseoflavus</i>	JCM 5653 =CBS 7824 =CCRC 22265 =IFO 10589 =NRRL Y-17182 =NRRL Y-17286	
<i>Sp. inostophilus</i>	JCM 5654 =CBS 7310 =IFO 10590 =NRRL Y-17293	
<i>Sp. kluyverinii</i>	JCM 6356 =CBS 7268 =IFO 10591 =NRRL Y-17211 =NRRL Y-17284	
<i>Sp. linderae</i>	JCM 8856 =CBS 7893	

(continued)



<i>Sp. novazealandicus</i>	JCM 8756	=CBS 7895	
<i>Sp. oryzicola</i>	JCM 5299	=CBS 7228 =IFO 10180	
<i>Sp. sasicola</i>	JCM 5979	=CBS 7285 =CCRC 22262 =IFO 10593 =NRRL Y-17183	
<i>Sp. singularis</i>	JCM 5356	=ATCC 24193 =CBS 5109 =DSM 70871 =IFO 10594 =NCYC 900 =NRRL Y-5852 =UCD 60-79	
<i>Sp. subbrunneus</i>	JCM 5278	=CBS 7196 =IFO 10168 =NRRL Y-17212 =NRRL Y-17292 =NRRL Y-17322	
<i>Sp. taupoensis</i>	JCM 8770	=CBS 7898	
<i>Sp. tsugae</i>	JCM 2960	=ATCC 19802 =CBS 5038 =CCRC 22373 =DSM 70746 =IFO 10595 =NRRL Y-5849 =UCD 60-71	
Genus <i>Symptodiomyces</i>			
<i>S. paphiopedii</i>	JCM 8318	=IAM 12803	D14006
Genus <i>Tilletaria</i>			
<i>T. anomala</i>	JCM 6353	=ATCC 24039 =CBS 436.72 =IFO 9559 =UBC 951	D83193
Genus <i>Tilletiopsis</i>			
<i>T. albescens</i>	JCM 5182	=ATCC 24343 =CBS 608.83 =UBC 926	D83188
<i>T. flava</i>	JCM 5186	=CBS 401.84 =IFO 6833	D82819
<i>T. fulvescens</i>	JCM 5187	=ATCC 24344 =CBS 607.83 =UBC 8006	D83189
<i>T. minor</i>	JCM 8361	=ATCC 10764 =CBS 543.50 =IMI 56590	D83190
<i>T. pallescens</i>	JCM 5230	=ATCC 24345 =CBS 606.83 =UBC 8007	D83191
<i>T. washingtonensis</i>	JCM 8362	=ATCC 36489 =CBS 544.50	D83192

3 ml のメタノールを加えて過剰の無水酢酸を分解後、トルエンとエバポレーターを用いて繰り返し洗浄し、ピリジンを除去した。得られたアルジトール・酢酸誘導体をクロロホルムに溶解し、ガスクロマトグラフィーによって糖組成を決定した。

ガスクロマトグラフィーは Shimadzu model GC-14A gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto)を用い、検出には hydrogen flame ionization detector を用いた。カラムは Rtx-2330 (0.25 mm X 30 m) (Restec Corporation, Bellsfonte, PA, U.S.A.) キャピラリカラムを用い、移動相はヘリウムを用いた。カラムは 175°C から 240°C まで (8°C/min) 昇温を行った後、240°C で 40 分保持した。Injector 部分の温度は 250°C とした。データの分析には Shimadzu Chromatopack C-R4A model (Shimadzu) を用いた。ピークの同定は中性糖 7 種のアルジトール・酢酸誘導体を標準として、保持時間により行った。細胞壁中性糖の組成は、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース及びグルコースの 7 種類の糖のモル比で表した。

#### 1.5. 18S rDNA の塩基配列に基づく系統解析

供試菌株の 18S rDNA 塩基配列は、第二章で述べた *Bensingtonia* 属、*Tilletiopsis* 属および *Tilletiaria anomala* の他、関連菌株のデータをデータベース (EMBL/GenBank/DBJ) から得て用いた (Table 4.2 および Appendix 1)。表中の *Rhodotorula aurantiaca* JCM 3771 の 18S rDNA 塩基配列は、第二章第二節 1.2.c を用いて決定した。アラインメントは、CLUSTAL W (Thompson, et al., 1994) を用いて行い、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) によって系統樹を作成した。塩基配列にイントロンを含む場合には、イントロンを除いた後、アラインメントを行った。各配列間の遺伝距離は Kimura (1980) の方法を用い、ギャップのある箇所を除いて計算した。各系統枝の統計学的解析にはブーツストラップ法を用い、1,000 回のサンプリングを行った。

## 2. 結果と考察

### 2.1. 細胞壁糖組成の分類指標としての安定性

Fig. 3.1 に *Sporidiobolus johnsonii* JCM 1840 の細胞壁画分および全菌体のクロマトグラムを例示した。全菌体の場合には、細胞壁のほかに、菌体内の貯蔵糖、中間代謝物などが含まれていると考えられ、培養日数などの条件により、糖組成が変化することが推定される。

Table 3.4 は、*Sporidiobolus johnsonii* JCM 1840 を培養開始後、2日目と6日目に集菌し、その全菌体および細胞壁中性糖の構成を調べた結果である。細胞壁の場合は培養2日目と6日目の糖組成がほとんど差が認められなかった。

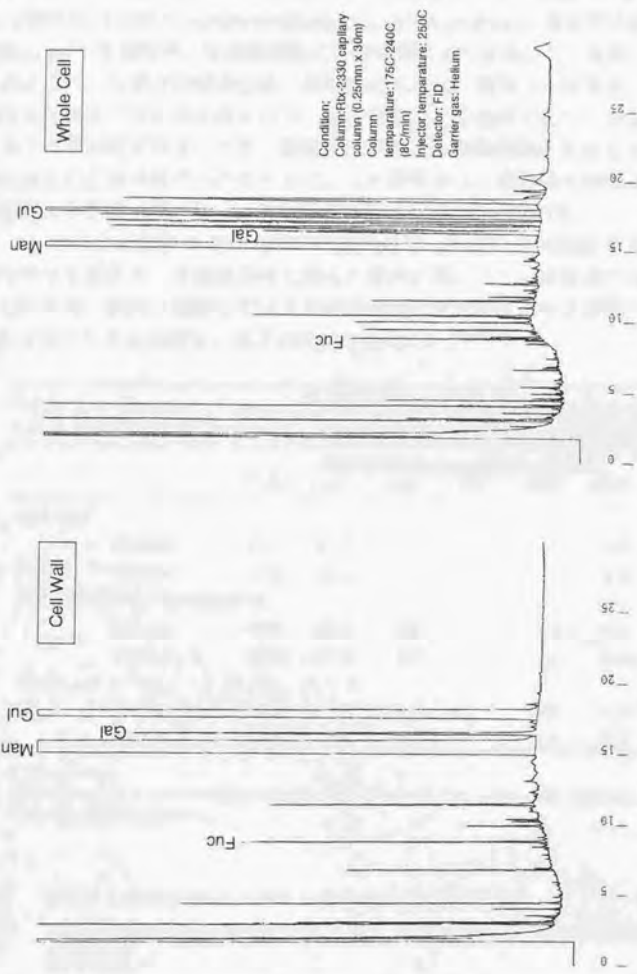


Fig. 3.1. Chromatogram of monosaccharide in cell wall and whole cell of *Sporidiobolus johnsonii* JCM 1840.

一方、全菌体の場合は細胞壁糖組成が2日目と6日目では大きく変動した。マンノースが相対的に減っているかのように見えるが、菌体内の貯蔵糖であるグリコーゲンの量が増加し、また、おそらくガラクトランのような多糖も合成され、ガラクトースの量が増えていることがこの差の原因であると思われる。Sugiyamaら(1985)は、*Rhodospiridium toruloides* YK 201 (type strain)の菌体中の糖組成が、培地のpH、培養時間、培養温度など培養条件により変動したと報告している。このように、全菌体の場合には、細胞壁のほかに、菌体内の貯蔵糖、中間代謝物などが含まれていると考えられ、培養日数などの条件により、糖組成が変化することが推定される。一方、細胞壁の場合は、培養開始後2日と6日の糖組成にほとんど差が認められなかった。この結果から、細胞壁の糖組成は、培養条件による影響は受けない、安定な形質であることが示された。

また、細胞壁をSDS溶液中で加熱処理、さらにProteinase Kを用いて処理を行った場合も、未処理の時と同様の結果が得られた。本結果から、本実験においては、試料に残留している夾膜や細胞壁結合蛋白質中の糖類の影響はほとんどないものと推定し、以下の実験を進めた。

Table 3.4. Changes of carbohydrate composition in cell wall and whole cell of *Sporidiobolus johnsonii* JCM 1840 depending on growth phase.

	Carbohydrate composition (mol%)						
	GLU	MAN	GAL	XYL	ARA	FUC	RHA
Cell Wall							
2 days	15.2	81.0	2.9	-	-	0.9	-
6 days	14.6	80.3	4.3	-	-	0.6	-
Cell Wall (SDS, Proteinase K)							
2 days	15.0	81.3	2.8	-	-	0.9	-
6 days	13.9	81.6	3.7	-	-	0.8	-
Whole cell							
2 days	21.5	67.6	6.4	-	3.0	1.6	-
6 days	41.4	7.4	48.1	-	2.7	0.4	-

-, Not detected.

Abbreviations: GLU, glucose; MAN, mannose; GAL, galactose; XYL, xylose; ARA, arabinose; FUC, fucose; RHA, rhamnose.

## 2.2. サビキン綱およびクロボキン綱菌種の細胞壁糖組成

—*Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属と *Tilleitopsis* 属の細胞壁糖組成による区別—

Table 3.5 に供試菌株の内、サビキン綱菌類の細胞壁糖組成を示した。サビキン綱菌類 44 種の主要構成糖はマンノースであった。この結果は Prillinger ら

Table 3.5. Carbohydrate composition of cell wall in the class Urediniomycetes

Scientific name	Carbohydrate composition (mol%)						
	GLU	MAN	GAL	XYL	ARA	FUC	RHA
Genus <i>Bensingtonia</i>							
<i>B. ciliata</i>	JCM 8865	23	71	3	-	3	-
<i>B. ingoldii</i>	JCM 7445	21	78	-	-	1	-
<i>B. intermedia</i>	JCM 5291	16	77	4	-	2	-
<i>B. miscanthi</i>	JCM 5733	33	61	5	-	1	-
<i>B. musae</i>	JCM 8801	9	90	-	-	1	-
<i>B. niagarensis</i>	JCM 5978	22	72	3	-	3	-
<i>B. phylladus</i>	JCM 7476	25	70	4	-	1	-
<i>B. sakaguchii</i>	JCM 10047	11	86	2	-	2	-
<i>B. subrosea</i>	JCM 5735	21	76	2	-	1	-
<i>B. yamatoana</i>	JCM 2896	20	76	1	-	2	2
<i>B. yuccicola</i>	JCM 6251	21	76	1	-	2	-
Genus <i>Erythrobasidium</i>							
<i>E. hasegawianum</i>	JCM 1545	32	66	2	-	-	-
Genus <i>Rhodotulura</i>							
<i>R. aumatiaca</i>	JCM 3771	13	80	7	-	1	-
<i>R. musilaginoso</i>	JCM 8115	12	78	7	-	1	1
<i>R. lactosa</i>	JCM 1546	12	71	10	-	1	7
<i>R. minuta</i>	JCM 3777	16	77	6	-	-	2
Genus <i>Sakaguchia</i>							
<i>S. dacryoidea</i>	JCM 3795	18	76	4	-	-	1
Genus <i>Sporidiobolus</i>							
<i>Sporid. johnsonii</i>	JCM 1840	15	81	4	-	1	-
<i>Sporid. pararoseus</i>	JCM 5350	21	76	2	-	1	-
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	16	67	10	-	7	-
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	21	70	6	-	3	-
<i>Sporid. salmonicolor</i>	JCM 1841	14	80	3	-	2	1
Genus <i>Sporobolomyces</i>							
<i>Sp. alborubescens</i>	JCM 5352	14	74	10	-	2	-
<i>Sp. coprosmae</i>	JCM 8772	24	74	3	-	-	-
<i>Sp. coprosmicola</i>	JCM 8767	22	64	8	-	5	-
<i>Sp. dimmenae</i>	JCM 8762	37	54	4	-	3	-
<i>Sp. dracophyllus</i>	JCM 8773	17	72	9	-	3	-
<i>Sp. elongatus</i>	JCM 5354	27	70	2	-	-	1
<i>Sp. falcatus</i>	JCM 8838	22	65	5	-	1	7
<i>Sp. follicola</i>	JCM 5355	19	80	1	-	-	-
<i>Sp. gracilis</i>	JCM 2963	23	75	1	-	1	-
<i>Sp. griseoflavus</i>	JCM 5653	16	70	2	-	5	5
<i>Sp. inositophilus</i>	JCM 5654	23	70	2	-	2	3
<i>Sp. klyverinellii</i>	JCM 6356	15	82	2	-	1	-
<i>Sp. linderiae</i>	JCM 8856	35	58	5	-	2	-
<i>Sp. novaezealandicus</i>	JCM 8756	31	55	10	-	3	1
<i>Sp. oryzicola</i>	JCM 5299	15	77	2	-	-	7
<i>Sp. sasicola</i>	JCM 5979	14	77	7	-	2	-
<i>Sp. singularis</i>	JCM 5356	18	70	4	-	3	4
<i>Sp. subbrunneus</i>	JCM 5278	35	55	6	-	4	-
<i>Sp. taupoensis</i>	JCM 8770	12	81	5	-	2	-
<i>Sp. tsugae</i>	JCM 2960	23	68	5	-	1	3

-, Not detected.

Abbreviations: GLU, glucose; MAN, mannose; GAL, galactose; XYL, xylose; ARA, arabinose; FUC, fucose; RHA, rhamnose.

(1991a)の結果と一致していた。本網の供試株はすべてグルコースを含んでいたが、キシロースは検出されなかった。供試した44種の内、42種がガラクトースを、また、33種がフコースを含んでおり、アラビノースやラムノースを含む種もあった。フコースを含まない種は *Erythrobasidium hasegawianum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. lactosa*, *R. minuta*, *Sakaguchia dacryoidea*, *Sporobolomyces coprosmae*, *S. elongatus*, *S. foliicola*, *S. gracilis*, *S. kluyverinii* および *S. oryzicola* の11種であった。

Table 3.6 にクロボキン綱に位置する、射出胞子形成酵母の *Tilletiaria* 属および *Tilletiopsis* 属、および射出胞子を形成しない *Sympodiomyopsis* 属の細胞壁構成糖を示した。これらの種は、主要構成糖がグルコースでそのほかにマンノースおよびガラクトースを含んでいた。さらに、サビキン綱菌類の細胞壁にはわずかながら含まれていた、フコース、アラビノース、ラムノースは検出されなかった。また、菌叢綱菌類の細胞壁に含まれているキシロースも検出されなかった。この結果は Prillinger ら (1990)の結果とほぼ一致した。

射出胞子形成酵母の属の分類は、現在、第一章の Table 1.6 に示したように、形態的な特徴と菌体中のキシロースの有無および主要ユビキノンによって行われている。この中で、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属は、両属とも菌体にキシロースを含まず、主要ユビキノンは Q-10 で、従来は、射出胞子の形や出芽細胞の有無といった形態的な特徴によって区別されてきた。*Tilletiopsis* 属は、比較的長い鎌型の射出胞子を形成することが特徴とされているが、*T. albescens* のように形が非対称形ではあるがやや短い胞子を作るものもある。従って、射出胞子の形によって、*Sporobolomyces* 属と明確に区別すること困難である。

Table 3.6. Carbohydrate composition of cell wall of the genus *Tilletiopsis* and related species

Scientific name		Carbohydrate composition (mol%)						
		GLU	MAN	GAL	XYL	ARA	FUC	RHA
Genus <i>Sympodiomyopsis</i>								
<i>S. paphiopedili</i>	JCM 8318	82	8	10	-	-	-	-
Genus <i>Tilletiaria</i>								
<i>T. anomala</i>	JCM 6353	98	-	1	-	-	-	-
Genus <i>Tilletiopsis</i>								
<i>T. albescens</i>	JCM 5182	96	1	2	-	-	-	-
<i>T. flava</i>	JCM 5186	82	2	15	-	-	-	-
<i>T. fulvescens</i>	JCM 5187	97	1	2	-	-	-	-
<i>T. minor</i>	JCM 8361	93	1	6	-	-	-	-
<i>T. pallascens</i>	JCM 5230	99	-	1	-	-	-	-
<i>T. washingtonensis</i>	JCM 8362	59	1	40	-	-	-	-

-, Not detected.

Abbreviations: GLU, glucose; MAN, mannose; GAL, galactose; XYL, xylose; ARA, arabinose; FUC, fucose; RHA, rhamnose

系統学的には、*Tilletiopsis* 属の種、および *Tilletiaria anomala* はクロボキン綱に位置し、*Tilletia caries* および *Sympodiomyces paphiopedili* などと系統枝を形成した。*Sporobolomyces* 属酵母はサビキン綱に位置しており、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属は系統的に異なっていることが示された (Fig. 2.3)。一方、担子菌類の3つの綱は細胞壁糖組成によるグルーピングと良く一致していた。すなわち、クロボキン綱ではグルコースが細胞壁の大部分を占めており、少量のマンノースおよびガラクトースを含んでいた。一方、サビキン綱ではマンノースが主要構成糖で、グルコースは約 20-30%、また、大部分の株がガラクトースおよびフコースを含んでいた。主要構成糖という観点から見れば、*Tilletiopsis* 属のそれはグルコースであるのに対し、*Sporobolomyces* 属ではマンノースである (Table 3.5 および 3.6)。従って、*Tilletiopsis* 属と *Sporobolomyces* 属は、細胞壁糖組成によって明確に区別されることが明かとなった。

### 2.3. サビキン綱におけるフコースの分類学的意義

サビキン綱は系統的には大きく3つのサブクラスターに分かれる。Fig. 3.2はサビキン綱の菌株の18S rDNAに基づく系統樹にその細胞壁糖組成を書き加えたものである。図中のサブクラスターは第二章第一節の通りである。

細胞壁にフコースを含まない、*Erythrobasidium hasegawianum*、*Rhodotorula aurantiaca*、*R. lactosa*、*R. minuta* および *Sakaguchia dacryoidea* は一つのサブクラスター (2c) を形成した。一方、フコースを含む菌株はサブクラスター 2a と 2b に位置していた。この結果から、サブクラスター 2c に位置する株は他の株と比較して、細胞壁にフコースを含まないという特徴が示された。サビキン綱の供試株 44 株の内、細胞壁にフコースを含んでいなかったのは上記 5 株以外に、*Sporobolomyces coprosmae*、*S. elongatus*、*S. foliicola*、*S. gracilis*、*S. kluyverinii* および *S. oryzae* (Table 3.5) であった。系統学的にはこれら 6 株も *E. hasegawianum* と系統枝を形成することが 18S rRNA、26S rDNA の部分塩基配列、および 18S rDNA 塩基配列の比較の結果から示されている (Fig. 2.3, Fell et al., 1995; Hamamoto and Nakase, in preparation; Nakase et al., 1993; Suh et al., 1996b; Yamada, Y. et al. 1994)。

Weijman と Rodrigues de Miranda (1988a) は *Rhodotorula* 属の全菌体糖組成について、現在 *R. minuta* のシノニムとされている *R. minuta* var. *texasensis* を除いては同様の結果を報告している。Prillinger ら (1991a) もまた、*R. minuta* の細胞壁にはフコースは含まれなかったと報告している。従って、これらの結果から、まだサンプルの数は少ないながら、サブクラスター 2c の株はサビキン綱の他のサブクラスターの株と比較して、細胞壁にフコースを含まないという特徴を持つと推定される。

Tsuchiya ら (1957, 1969) は、血清学的なデータに基づき、*Rhodotorula* 属

	Carbohydrate composition (mol%)							
	GLU	MAN	GAL	XYL	ARA	FUC	RHA	
23	71	3	-	-	-	-	3	-
22	72	3	-	-	1	3	-	-
25	70	4	-	-	-	1	-	-
21	76	1	-	-	-	2	-	-
25	69	4	-	-	-	1	-	-
21	76	2	-	-	1	1	-	-
33	61	5	-	-	-	-	1	-
11	86	2	-	-	-	2	-	-
9	90	-	-	-	1	1	-	-
21	78	-	-	-	-	-	1	-
12	78	7	-	-	1	1	1	-
16	74	9	-	-	-	-	-	-
15	81	3	-	-	-	-	1	-
24	70	5	-	-	-	1	-	-
29	60	7	-	-	-	4	-	-
18	77	4	-	-	1	2	-	-
20	76	1	-	-	-	2	2	-
13	80	7	-	-	1	-	-	-
32	66	2	-	-	-	-	-	-
12	71	10	-	-	1	-	7	-
16	77	6	-	-	-	-	2	-
18	76	4	-	-	-	-	-	1

-, Not detected.  
 Abbreviations: GLU, glucose; MAN, mannose; GAL, galactose; XYL, xyllose;  
 ARA, arabinose; FUC, fucose; RHA, rhamnose.  
 \*, Prilegge et al. (1991a).

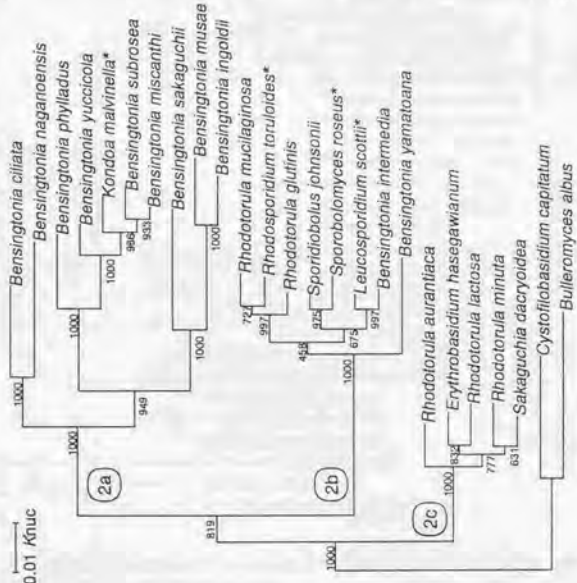


Fig. 3.2. Phylogenetic tree of the species in the class Urediniomycetes with carbohydrate composition of cell wall.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1,653 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicate bootstrap sampling.



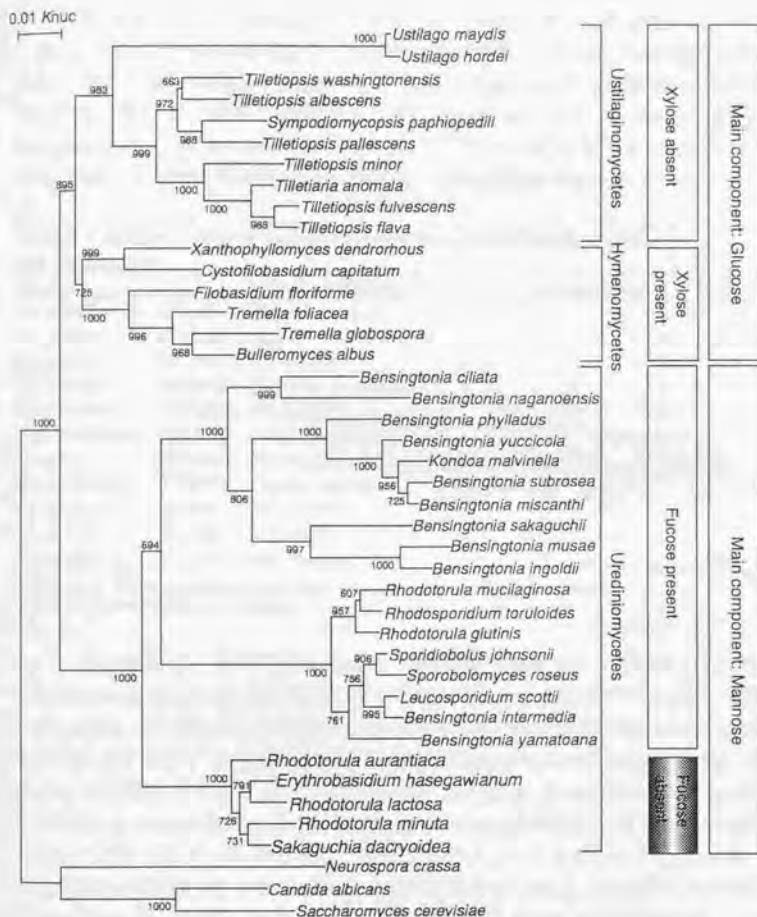


Fig. 3.3. Phylogenetic tree of basidiomycetes based on 18S rDNA sequences with carbohydrate composition of cell wall.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1990) based on 1489 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicate bootstrap sampling.

および *Sporobolomyces* 属は大きく 2 つに分けられると報告した。彼らは、*Rhodotorula* 属および *Sporobolomyces* 属は共通抗原 1 をもつグループと共通抗原 4 を持つグループに分けられ、またこれら 1 と 4 の抗原は交差反応しない、と述べている (Table 3.7)。系統樹上では (Fig. 3.2)、共通抗原 1 の株はサブクラスター 2b に位置し、*R. minuta* はサブクラスター 2c に位置している。Tsuchiya らのデータの中の *S. salmonicolor*、*S. pararoseus* および *S. gracilis* の 3 株は Fig. 3.4 には含まれていないが、先の 2 株はサブクラスター 2b に、また *S. gracilis* は、*E. hasegawianum* や *R. minuta* とともにサブクラスター 2c に位置すると報告されている (Fell et al., 1995; Hamamoto and Nakase, in preparation; Nakase et al., 1993)。

Table 3.7. Antigenic factor of several species of the genera *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*\*

Species	Strain	(Should be classified in:)	Antigenic factor			
<i>Sp. salmonicolor</i>	IFO 0374	( <i>Sp. salmonicolor</i> )	1			8 9
<i>Sp. odorus</i>	NI 7592	( <i>Sporid. salmonicolor</i> )	1			8 9
<i>Sp. roseus</i>	NI 7593	( <i>Sp. roseus</i> )	1			8 9
<i>Rh. glutinis</i>	IFO 0559	( <i>Rhodosp. toruloides</i> )	1 2	5		8
<i>Rh. aurantiaca</i>	IFO 0386	( <i>Rh. glutinis</i> )	1 2	5		8
<i>Rh. mucilaginoso</i>	IFO 0002	( <i>Rh. mucilaginoso</i> )	1	3		8
<i>Rh. rubra</i>	IFO 0382	( <i>Rh. mucilaginoso</i> )	1 2 3			8
<i>Sp. pararoseus</i>	IFO 0376	( <i>Sporid. pararoseus</i> )	1			11
<i>Sp. gracilis</i>	NI 7598	( <i>Sp. gracilis</i> )		4	6	
<i>Rh. minuta</i>	IFO 0387	( <i>Rh. minuta</i> )		4	7	
<i>Rh. pallida</i>	IFO 0715	( <i>Rh. minuta</i> )		4	6	10

\*Tsuchiya et al. 1969, modified. Genus abbreviations: *Rhodosp.*, *Rhodospiridium*; *Rh.*, *Rhodotorula*; *Sporid.*, *Sporidiobolus*; *Sp.* *Sporobolomyces*

Tsuchiya ら (1969) は報告の中で、共通抗原 1 のグループの中の IFO 0386 を *Rhodotorula aurantiaca* として用いている。これは Tsuchiya らが "The yeasts", 第 1 版 (Lodder and Kreger-van Rij, 1952) の *Rhodotorula* 属の分類体系に従っていたためと推定される。本菌株 (*Torula koishikawaensis* IFO 0386) は現在では *R. glutinis* に分類されており (Hasegawa, 1965)、現在の *R. aurantiaca* とは異なった種である。*R. glutinis* は Fig. 3.2 に示した通り、18S rDNA 塩基配列に基づく系統樹ではサブクラスター 2b に位置し、また菌体にフコースを含んでいた。一方、*R. aurantiaca* は、サブクラスター 2c に位置しており (Fig. 3.2)、細胞壁にフコースは含まなかった。*R. aurantiaca* の系統学的位置については、同様の結果が、26S rDNA の部分塩基配列に基づく系統解析からも得られている (Fell et al., 1995)。従って、彼らの 2 つの血清学的データに基づくグループは、18S rDNA に基づく系統樹のサブクラスター 2b と 2c にそれぞれ対応していると推察される。

以上の結果から、サブクラスター 2c は細胞壁にフコースがない点で他の 2 つのサブクラスターと区別できることが明らかとなった。

#### 2.4. 細胞壁糖組成の分類学および系統学的意義

現在、担子菌系酵母の分類では、菌体中のキシロースの有無が属レベルの分類指標として用いられている (Table 1.6)。Weijman ら (1988b) はこの性質に基づき、*Cryptococcus* 属および *Rhodotorula* 属の再定義を行い、両属の種の再分類を行った。また、それまで *Candida* 属に含まれていた一部の担子菌系酵母を、この指標に照らし合わせて *Cryptococcus* 属または *Rhodotorula* 属に移した。Suzuki と Nakase (1988) も *Bullera* 属と *Sporobolomyces* 属の分離をこの性質に基づいて行った。近年の分子生物学の発達により、担子菌類の 3 つの綱の内、細胞壁にキシロースを有するのは菌叢綱だけであることが明らかとなり、菌体中のキシロースの有無の分類指標としての評価が確立された。

現在知られている担子菌系酵母の多くは、サビキン綱または菌叢綱の 2 つの綱に位置している。従って、ある酵母がサビキン綱あるいは菌叢綱のどちらに位置するのかわかるためには、菌体中のキシロースの有無は重要なキーとなる。しかしながら、クロボキン綱の菌類も菌体中にキシロースを含まず、この点ではサビキン綱の菌類と区別できない。クロボキン綱には、報告されている酵母の種の数は少ないが、*Malassezia* 属、*Pseudozyma* 属、*Sympodiomyopsis* 属、*Tilletiopsis* 属などが位置する。Swann と Taylor (1993) が述べたように、担子菌類の 3 つの大きなクラスターは細胞壁の主要構成糖とキシロースの有無という 2 つの性質の組み合わせによって、互いに区別される。従って、属レベルの分類指標としてはキシロースの有無だけではなく、主要構成糖との組み合わせとして用いる方が望ましいと思われる (Table 3.8)。

本研究において、細胞壁中性糖の分析データから、主要構成糖をマンノースとするサビキン綱は細胞壁のフコースの有無により、2 つのグループに分別できることが示唆された (Fig. 3.3)。この結果に基づき、細胞壁の糖組成という観点に立つと、担子菌類は主要構成糖がグルコースかマンノースかに基づいて 2 つの大きなグループに分けることができる。さらに、これら 2 グループはキシロースの有無、あるいはフコースの有無によってそれぞれ 2 つのグループに細分される、と推定される。第二章で述べたように、サビキン綱の 3 つのサブクラスターは、18S rDNA 塩基配列の類似度の観点から見れば、それぞれ目または垂目に対応する広がりをもったクラスターであろうと推定される。Actinobacteria 綱の場合は、これらを sequence signature でしか識別できなかったが、サビキン綱では、サブクラスター 3 つの内の一つが、細胞壁の糖組成によって識別できることが明らかとなった。

今後、細胞壁におけるフコースの局在を確認するなど、生理学的意義の研究と同時に、さらに広範囲の菌株に対して、フコースの存在の確認を行う必要がある。そして、その研究の後、サビキン綱のフコースを含まないサブクラ

Table 3.B. Salient characteristics among ballisticonidium-forming yeasts and related genera

Class	Teleomorph	Basidial form <sup>v</sup>	Teliospore <sup>v</sup>	Septal pore structure <sup>a</sup>	Ballistoconidium <sup>v</sup>	Stalked conidium <sup>v</sup>	Budding cell <sup>v</sup>	Major sugar component of cell wall <sup>b</sup>	Xylose in cell wall <sup>b</sup>	Major ubiquinone <sup>d</sup>	Anamorph
Ustilaginomycetes	?				-		+			Q9	<i>Malassezia</i> ?
	<i>Tilletiaria</i>	phragmo	+	primitive dolipore	+		-/+	glucose	-	Q10	<i>Tilletiopsis</i>
	<i>Entyloma</i> ?				-		+				<i>Sympodiomyces</i>
	?										<i>Pseudozyma</i>
Urediniomycetes	?				-		-			Q9	<i>Sterigmatomyces</i>
	<i>Korba</i>				+		-/+				<i>Bensingtonia</i>
	<i>Leucosporidium</i>	phragmo	+	simple pore	-		+	mannose	-	Q9/Q10	<i>Rhodolorula</i>
	<i>Rhodosporeidium</i>				-		+			Q10	<i>Kurtzmanomyces</i>
Hymenomycetes	?				-		-/+			Q10(H <sub>2</sub> )	<i>Sporobolomyces</i>
	<i>Sporidiobolus</i>	holo/phragmo	+	simple pore	+		-			Q8	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Erythrobasidium</i>	holo	-		-		+				<i>Itersonilia</i>
	<i>Cystofitobasidium</i>	holo	+		-					Q9/Q10	<i>Cryptococcus</i>
Hymenomycetes	<i>Mrakia</i>				+						<i>Trichosporon</i>
	?										<i>Butleria</i>
	<i>Filobasidium</i>	holo	-	dolipore	-		+				<i>Phaffia</i>
	?				-						<i>Udeniomyces</i>
	<i>Butleromyces</i>	phragmo	-		+			glucose	+		<i>Kockovaella</i>
	<i>Xanthophyllomyces</i>				+					Q10	<i>Cryptococcus</i>
Hymenomycetes	?				-		-				<i>Fellomyces</i>
	<i>Filobasidiella</i>	holo	-	dolipore	-						
	<i>Sterigmatosporidium</i>			?			+				

<sup>v</sup>, Kurtzman and Fall (1998).

<sup>a</sup> Boekhout (1991b), Boekhout et al. (1992b), Johnson-Reid and Moore (1972), Kwon-Chung and Poplin (1978), Moore (1972), Moore and

Kreger-van Rij (1972), Nakagiri and Tuhak (1983), Oerwinster et al. (1985), Sun and Sugiyama (1992b), and Suh et al. (1993).

<sup>b</sup>, Prillingner et al. (1990, 1991a, 1991b), this study.

スターについては、新たな高次分類群として独立させるのが適当と思われる。

## 第四章 タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の同定と分布

### 第一節 緒言

これまで、中瀬とその共同研究者たちは日本各地、およびニュージーランドの植物から射出胞子形成酵母を分離し、分類学的研究を行ってきた (Hamamoto and Nakase, 1995, 1996; Nakase and Suzuki, 1985, 1986a-c, 1987a-e, 1988; Nakase et al., 1987a-b, 1989, 1990a-b, 1990b, 1994)。また、国外においても、射出胞子形成酵母の分類学的研究は盛んとなり、多くの新分類群が発見され、記載された (Buhagiar et al., 1983; Ingold, 1986; Johri and Bandoni, 1984; Li, 1982; Shivas and Rodrigues de Miranda, 1983; van der Walt et al. 1986, 1988, 1989)。また、ここ数十年の間に属の数も増加した。すなわち、有柄分生子をもつ属 (*Kockovaella* 属および *Sporobolomyces* 属の一部) や、主要ユビキノンが Q-9 の属 (*Bensingtonia* 属) が発見された。また、*Bullera* 属と射出胞子の形態以外では区別がつかないにもかかわらず、系統的には異なった *Udeniomyces* 属の存在も確認された。1998 年発行の "The yeasts", 第 4 版には、*Udeniomyces* 属は *Bullera* 属のシノニムとして扱われているが、射出胞子形成能をもつ酵母として計 12 属 60 種が記載されている。

多くの新分類群の発見と分類手法の発達により、これら射出胞子形成酵母は、多様性に富んだ菌群であることが示された。また、分子生物学の発達により、射出胞子を形成する菌類は、系統的には、担子菌類の 3 つの綱のすべてに他の担子菌系酵母を含む菌類と混じりながら位置することが明らかになった。これは射出胞子形成能の有無は、必ずしも菌類の系統を反映していないことを示すものである。しかし、同時に、射出胞子形成酵母をさらに深く研究することによって、担子菌類の系統を演繹することが可能であることを示唆している。

中瀬とその共同研究者たちによるこれまでの研究は、日本、ニュージーランド等、主に温帯地域の植物から分離した射出胞子形成酵母を対象に行われた。また、外国の研究者たちの研究も、主に、温帯地域の射出胞子形成酵母に対して行われた。一方、熱帯地域の植物に棲息する射出胞子形成酵母の分類学および系統学的研究も、中瀬らによって 1987 年から開始された。熱帯の植物相は温帯域のそれとは全く異り、また、極めて多様である。従って、そこに棲息する射出胞子形成酵母も、温帯域のものとは異なった多様性を示していると推定されるからである。本章では、タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の系統分類について、特に、新分類群を中心に述べた。また、タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の分布について、日本およびニュージーランドの場合と比較した。

### 第二節 射出胞子形成酵母の同定

## 1. 材料および方法

### 1.1. 供試菌株

本研究で用いた菌株は、1987年と1990年の2回にわたって中瀬と Fungsin (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand)が、熱帯地域であるタイの植物から分離した。1987年の分離ではタイの Ayuthaya 付近と Bangkok 郊外で採集した植物から改良射出胞子捕集法 (Nakase and Suzuki, 1985)により149株の酵母を分離し、そのうち、63株が射出胞子形成酵母であった (Attasampunna et al., 1989)。1990年の分離では、Bangkokの東南にある海岸地帯の植物から223株を分離し、そのうち、73株が射出胞子形成酵母であった。これら136株を供試菌として用いた (Table 4.1)。

### 1.2. 形態学および生理生化学的性状

分離した射出胞子形成酵母は純化の後、“The yeasts”, 第3版に掲載されている方法 (van der Walt and Yarrow, 1984)に従って、形態学および生理生化学的試験を行った。射出胞子形成酵母はビタミンの要求が複雑なものもあるため、炭素源ならびに窒素源の資化性試験時には、微量栄養素として、50 ppm の Yeast Extract (Difco Laboratories)および Casamino Acids (Difco Laboratories)を加えた。ビタミン要求性試験は Komagata と Nakase (1967)の方法に従って行った。生育最高温度は、供試株を12 mmの試験管中のYM brothに接種し、1°Cきざみに温度を設定したメタルブロックを用いて決定した。射出胞子形成酵母の内、*Kockovaella* 属および *Sporoholomyces* 属の一部は有柄分生子を形成する。有柄分生子は、YM agar (Difco Laboratories)で25°C、7日間培養後の細胞形態を顕微鏡で観察した。

得られた射出胞子の形態、有柄分生子の有無および生理生化学性状に基づき、供試株のグルーピングを行った。グルーピングの後、各グループの形態および生理生化学性状を既知の種と比較して同定した。

### 1.3. 化学分類学的手法

#### 1.3.1. 主要ユビキノンの同定

供試菌は250 mlのYM brothを含む500 ml三角フラスコ中で、25°Cで震盪培養し、定常期に集菌した。菌体は脱イオン水でよく洗浄し、使用時まで-20°Cで保存した。

主要ユビキノンの分離、精製、同定は Nakase と Suzuki (1986d)の方法に従った。菌体をNaOHにより鹼化後、ヘキサンを用いてユビキノンを直接抽出した。ユビキノンの精製は、抽出物を濃縮後、薄層クロマトグラフィーによって行った。薄層クロマトグラフィーは Kiesel gel 60 F254 (Merck, Darmstadt,

Table 4.1. Yeast strains used in this study

Isolated in 1987			Isolated in 1990		
Strain	Sample	Source	Strain	Sample	Source
K-2	1	<i>Pennisetum pedicellatum</i>	K-203	1	<i>Imperata cylindrica</i>
K-3	1		K-204	1	
K-15	6	<i>Imperata cylindrica</i>	K-215	3	<i>Typha angustifolia</i>
K-17	6		K-228	4	<i>Fimbristylis</i> sp.
K-19	6		K-230	5	<i>Blumea</i> sp.
K-20	7	<i>Typha angustifolia</i>	K-233	5	
K-21	8	<i>Samanea saman</i>	K-237	6	<i>Cyperus</i> sp.
K-27	9	<i>Oryza</i> sp.	K-242	6	
K-29	9		K-243	7	<i>Eragrotis</i> sp.
K-32	9		K-244	7	
K-35	10	<i>Oryza sativa</i>	K-245	7	
K-38	10		K-255	9	<i>Dactyloctenium aegyptium</i>
K-39	10		K-259	10	<i>Imperata cylindrica</i>
K-41	11	<i>Ananas comosus</i>	K-261	10	
K-52	15	<i>Typha angustifolia</i>	K-262	10	
K-53	15		K-271	11	<i>Pennisetum</i> sp.
K-54	15		K-272	11	
K-56	15		K-273	12	<i>Melaleuca leucadendra</i>
K-57	15		K-274	12	
K-59	19	<i>Musa sapientum</i>	K-276	12	
K-62	19		K-279	13	<i>Synedrella nodiflora</i>
K-63	19		K-281	13	
K-64	19		K-283	13	
K-76	31	<i>Oryza sativa</i>	K-285	14	<i>Aristida balansae</i>
K-77	31		K-286	14	
K-79	31		K-289	16	<i>Antigonon leptopus</i>
K-80	31		K-290	16	
K-81	32	<i>Saccharum spontaneum</i>	K-292	16	
K-82	32		K-297	16	
K-83	32		K-298	18	<i>Musa paradisica</i>
K-84	32		K-299	18	
K-85	32		K-300	18	
K-87	32		K-302	18	
K-90	33	<i>Imperata cylindrica</i>	K-304	18	
K-91	33		K-305	19	<i>Oryza sativa</i>
K-92	33		K-308	19	
K-93	33		K-311	20	<i>Oryza sativa</i>
K-94	33		K-316	21	<i>Neyraudia reynaudiana</i>
K-95	33		K-322	22	<i>Echinoochloa colonum</i>
K-97	33		K-325	22	
K-99	34	<i>Phragmites karka</i>	K-327	23	<i>Pennisetum</i> sp.
K-100	35		K-328	23	
K-101	35		K-331	22	<i>Echinoochloa colonum</i>
K-103	35		K-332	24	<i>Mangifera indica</i>
K-105	35		K-335	24	
K-107	36	<i>Oryza sativa</i>	K-336	25	<i>Saccharum officinarum</i>

(continued)



K-109	36		K-337	25	
K-110	37	<i>Oryza sativa</i>	K-338	26	<i>Imperata cylindrica</i>
K-111	37		K-339	26	
K-114	38	<i>Oryza sativa</i>	K-342	26	
K-116	39	<i>Cyperus cyperinus</i>	K-344	26	
K-117	39	<i>Cyperus cyperinus</i>	K-344	26	
K-119	39		K-345	26	
K-121	39		K-346	27	<i>Eucalyptus</i> sp.
K-122	40	<i>Oryza sativa</i>	K-349	27	
K-123	40		K-351	27	
K-124	41	<i>Oryza sativa</i>	K-353	28	<i>Merrymia</i> sp.
K-125	41		K-354	28	
K-129	41		K-362	29	<i>Ageratum conyzoides</i>
K-132	42	<i>Oryza sativa</i>	K-368	32	<i>Ageratum conyzoides</i>
K-139	1	<i>Pennisetum pedicellatum</i>	K-369	32	
K-140	1		K-373	33	<i>Pennisetum</i> sp.
K-152	31	<i>Oryza sativa</i>	K-379	35	<i>Pennisetum pedicellatum</i>
			K-382	35	
			K-383	35	
			K-384	36	<i>Cyperus cyperinus</i>
			K-389	37	<i>Neyraudia reynaudiana</i>
			K-390	37	
			K-394	38	<i>Neyraudia reynaudiana</i>
			K-399	39	<i>Oryza sativa</i>
			K-401	39	
			K-408	39	
			K-414	40	<i>Oryza sativa</i>

---

Reference strains

---

Scientific name	JCM No.	Other designations
<i>Bensingtonia ingoldii</i>	JCM 7445	=CBS 7424 =IFO 10578
<i>Bensingtonia intermedia</i>	JCM 5291	=ATCC 66425 =CBS 7226 =IFO 10178
<i>Bensingtonia naganoensis</i>	JCM 5978	=CBS 7286 =IFO 10580
<i>Bensingtonia yamatoana</i>	JCM 2896	=CBS 7243 =IFO 10583 =NRRL Y-17308
<i>Bullera hanna</i>	JCM 8937	
<i>Kockovaella thailandica</i>	JCM 7824	=CCRC 22489 =IFO 10520
<i>Kockovaella imperatae</i>	JCM 7826	=CCRC 22491 =IFO 10521
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	JCM 1840	=ATCC 10765 =CBS 5470 =IFO 6903
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JCM 5350	=ATCC 24260 =CBS 484 =NRRL Y-5479
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	=ATCC 20489 =CBS 5001 =IFO 1689
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	=ATCC 18159 =CBS 5811 =IFO 14226
<i>Sporidiobolus microsporus</i>	JCM 6882	
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	JCM 1841	=CBS 490 =NRRL Y-5483 =UCD 68-371
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	JCM 5352	=ATCC 24216 =CBS 482 =IFO 10585
<i>Sporobolomyces follicola</i>	JCM 5355	=ATCC 52909 =CBS 8075 =IFO 10588
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	JCM 2963	=ATCC 24258 =CBS 71 =IFO 1033 =IFO 1227
<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	JCM 5296	=ATCC 34889 =CBS 1522 =IFO 1034
<i>Sporobolomyces phyllomatis</i>	JCM 7549	=CBS 7198 =NRRL Y-17294
<i>Sporobolomyces roseus</i>	JCM 5353	=ATCC 24257 =CBS 486 =NRRL Y-5506
<i>Sporobolomyces salicinus</i>	JCM 2959	=CBS 6983 =IFO 10592 =NRRL Y-17291
<i>Tilletiopsis flava</i>	JCM 5186	=CBS 401.84 =IFO 6833
<i>Tilletiopsis fulvescens</i>	JCM 5187	=ATCC 24344 =CBS 607.83 =UBC 8006
<i>Tilletiopsis minor</i>	JCM 8361	=ATCC 10764 =CBS 543.50 =IMI 56590

Germany)プレートと、展開溶媒としてベンゼンを用いた。薄層プレートには同時に標準ユビキノン(Q-9およびQ-10, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)もスポットした。UVランプ下で、供試菌株のユビキノンの移動位置を標準ユビキノンと比較して確認後、当該画分をスパーテルで掻きとった。掻きとった画分から、ヘキサンを用いてユビキノンを抽出し、サンプルとした。

ユビキノン分子種の同定は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって行った。HPLCはShimadzu model LC-6A Liquid Chromatograph (Shimadzu)を用い、カラムはCOSMOSIL packed column 5C18 (4.6 X 150 mm) (Nacalai tesque, Kyoto)、検出器はSPD-6A spectrophotometric detector (Shimadzu)、またデータの分析にはShimadzu Chromatopack C-R3A model (Shimadzu)を用いた。カラム温度は室温とし、移動相はメタノール:2-プロパノール(2:1, vol/vol)、2 ml/minで、275 nmにおける吸光度を測定した。ピークの同定は標準ユビキノンをを用い、保持時間により行った。

### 1.3.2. 菌体中のキシロースの有無

供試菌は250 mlのYM brothを含む500 ml三角フラスコ中で、25°Cで震盪培養し、定常期に集菌した。菌体は脱イオン水でよく洗浄し、次いでアセトンで洗って乾燥させた。

菌体中のキシロースの有無はSuzukiとNakase(1988)の方法によって行った。約100 mgの乾燥菌体を1 mlの2 M トリフルオロ酢酸溶液(TFA)に懸濁し、メタルブロックを用いて、100°Cで3時間加水分解を行った。室温になるまで放置後、濾紙を用いて未分解の残渣を取り除いた。ロータリーエバポレーターを用いてTFAをいた後、0.5 mlの脱イオン水に溶解した。これに、Amberlite IR 410 (OH-)を加えて中和し、フィルター濾過してサンプルとした。

菌体中のキシロースはHPLCにより検出した。HPLCはSSC 3000 flow system (Senshu Scientific Company, Tokyo)を用い、カラムはShodex SP 1010 (Showa Denko, Tokyo)、およびShodex RS pak DS-613 (Showa Denko)の2種類を用いた。移動相はShodex SP 1010の場合は水(0.8 ml/min、カラムオープン温度80°C)を、Shodex RS pak DS-613の場合はアセトニトリル:水(80:20, 0.8 ml/min、カラムオープン温度75°C)を用い、検出には示差屈折計(ERC-7520, Erma Optical Works, Tokyo)を用いた。データの分析にはShimadzu Chromatopack C-R3A modelを用いた。ピークの同定は、作成した各種中性糖水溶液を標準液として用い、これらの保持時間により行った。

### 1.3.3. G+C含量

#### 1.3.3.1. 核DNAの抽出および精製

DNA の抽出および精製は以下の3通りの方法により行った。担子菌系酵母は、子囊菌系酵母と異なり、一般に、酵素的に溶菌することが困難であるため、DNA抽出の際には、菌体を機械的に破碎することが必要である。菌体破碎のために、以下の3つの方法を行った。

a) 湿菌体をフレンチプレスで破碎

本方法は Hamamoto と Nakase (1995) に従ったものである。供試菌は 250 ml の YM broth を含む 500 ml 三角フラスコ中で、25°C で震盪培養し、対数増殖期後期に集菌した。菌体は脱イオン水、次いで saline-EDTA (0.1M EDTA を含む 0.15M NaCl 溶液、pH 8.0) でよく洗浄して、使用時まで -20°C で保存した。

菌体を約 2 容量の 12.5 mM EDTA および 150 mM NaCl を含む 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁し、フレンチプレス (FRENCH Pressure Cell Press FA-073, SLM Instrument, USA) を用いて、10,000 psi の圧力で破碎した。破碎後の菌体懸濁液に、最終濃度が 1%、および 4.5 mAnson unit/ml となるよう 10% SDS 溶液と proteinase K (Merck) を加え、ゆっくり震盪しながら 50°C で 3 時間インキュベートした。その後、1 容量の TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.6) 飽和フェノールを加え、除タンパクを行い、次いで、TE 飽和フェノール:クロロホルム (1:1 vol/vol)、さらに、クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) で除タンパクを行った。遠心上清を分取し、RNase A (Sigma R5125) および RNase T1 (Sigma R8251) を加え、ゆっくり震盪しながら 37°C で 1 時間反応させた。クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) を用いて再び除タンパクを行い、上清に 1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 2.5 容量のエタノールを加え、-20°C に 30 分放置して、DNA を沈殿させた。沈殿物を 70%、次いで 99.5% エタノールで洗浄後、真空下で乾燥させ、これを TE に溶解した。DNA 溶液 1 ml 当たり 1 g の塩化セシウムを加え、完全に溶解後、1/10 容量の臭化エチジウム (50 mg/ml) を加え、よく攪拌した。これを Beckman Ti-50 ローターを用いて、15°C で 45,000 rpm、36-40 時間超遠心を行った。超遠心の後、遠心チューブに UV ランプを照射して核 DNA 画分を確認しながら、これをシリンジで採取した。採取した DNA 溶液に等量の塩化セシウムを飽和させた 2-プロパノール溶液を加えて攪拌し、5,000 rpm で 1 分間遠心して、臭化エチジウムを除去した。この操作を DNA 溶液の臭化エチジウムの色が完全に取り除かれるまで繰り返して行った後、DNA 溶液を TE に透析して塩化セシウムを除去した。透析後、DNA 溶液に 1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 2.5 倍容量のエタノールを加えて DNA を沈殿させ、遠心によって集めた。さらにこれを 1mM EDTA を含む 0.3 M 酢酸ナトリウム (pH 7.0) に溶解し、0.54 容量の 2-プロパノールを加えて再び DNA を沈殿させた。この沈殿物を遠心によって集め、これを精製 DNA として以後の実験に用いた。

b) 湿菌体をブラウンセルホモジナイザーで破碎

本方法は Nakase と Suzuki (1986c) の方法に改良を加えたものである。供試菌は 250 ml の YM broth を含む 500 ml 三角フラスコ中で、25°C で震盪培養し、対数増殖期後期に集菌した。菌体は脱イオン水、次いで 5 mM EDTA を含む 1/15 M リン酸バッファー (pH 7.2) でよく洗浄して、使用時まで -20°C で保存した。

菌体を 5 mM EDTA を含む 1/15 M リン酸バッファー (pH 7.2) に懸濁し、ブラウンセルホモジナイザーにより、顕微鏡下で細胞の約 30 % が破碎される程度まで破碎を行った。ガラスビーズを除くため、懸濁液を 1000 rpm で 10 分間遠心した。その上清に最終濃度 1 % となるように SDS 溶液を加え、50°C で 30 分間ゆっくり震盪して DNA を抽出した。次いで、0.1 g の過塩素酸ナトリウムおよび等容量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) を加え、激しく震盪、攪拌し、8,000 rpm で 20 分間遠心して除タンパクを行った。上清に、もう一度クロロホルム:イソアミルアルコールを加えて、同様の操作により除タンパクを行った。遠心上清に 2 容量のエタノールを加えて、4°C で 1 晩置き DNA を沈澱させた。3,000 rpm で 10 分間遠心し、DNA を集めて、70 % エタノールで洗浄した後、減圧下でエタノールを除去した。これを TE に溶解し、RNase A および RNase T1 を加えて、37°C で 1 時間、インキュベートし、さらに Proteinase K を加えて 37°C、1 時間インキュベートした。反応後、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) を加えて、よく震盪し、8,000 rpm で 20 分遠心した。上清に 2 容量のエタノールを加えて、ガラス棒をもちいて DNA をまきとり、70 %、80 %、90 %、99.5 % のエタノールに浸して洗浄した。得られた DNA を 1/10 SSC 溶液に溶解し、同様に RNase A および T1、および Proteinase K による処理を行った。等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) を加えて除タンパクの後、上清に 1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 0.54 容量の 2-プロパノールを加えて、再びガラス棒に巻きとり、70 %、80 %、90 %、99.5 % のエタノールにて洗浄した。この操作は DNA を巻きとる際の母液が透明になるまで行い、これを精製 DNA として以後の実験に用いた。

c) 凍結乾燥菌体を乳鉢と乳棒で破碎

本方法は Raeder と Broda (1985) の方法に従って菌体を破碎して DNA を抽出し、精製を行ったものである。供試菌は 250 ml の YM broth を含む 500 ml 三角フラスコ中で、25°C で震盪培養し、対数増殖期後期に集菌した。菌体は脱イオン水でよく洗浄し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥菌体は使用時まで、デシケーター中で 4°C で保存した。

凍結乾燥菌体を乳鉢と乳棒を用いて破碎後、DNA 抽出用バッファー (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) に懸濁し、50°C で 30

分間ゆっくり震盪して DNA を抽出した。これに等容量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1, vol/vol)を加えて激しく震盪攪拌し、8,000 rpm で 20 分遠心して除タンパクを行った。遠心上清に 0.54 容量の 2-プロパノールを加えて 4°C で 1 晩放置し、DNA を沈澱させた。15,000 rpm で 10 分間遠心し、DNA を集めて、70 % エタノールで洗浄した後、減圧下でエタノールを除去した。これを TE に溶解し、DNA 溶液 1 ml あたり 1 g の塩化セシウムを加え、完全に溶解後、1/10 容量の臭化エチジウム (50 mg/ml) を加え、よく攪拌して混和した。これを Beckman TLA 100.4 ローターで 15°C で 100,000 rpm、20 時間超遠心を行った。超遠心の後、遠心チューブに UV ランプを照射して核 DNA 画分を確認しながら、これをピペットで採取した。採取した DNA 溶液に等量の水飽和 1-ブタノール溶液を加えて攪拌し、3,000 rpm で 3 分間遠心して、臭化エチジウムを除去した。この操作は DNA 溶液の臭化エチジウムの色が完全に取り除かれるまで、繰り返して行った。その後、DNA 溶液を 1/10 SSC に透析して塩化セシウムを除去した。得られた DNA 溶液に RNase A および RNase T1 を加えて、37°C で 1 時間インキュベートし、さらに Proteinase K を加えて 37°C で 1 時間インキュベート後、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, vol/vol) を加えてよく震盪し、除タンパクを行った。遠心上清に 1/10 容量の 10 M 酢酸アンモニウムおよび 0.54 容量の 2-プロパノールを加え、ガラス棒を用いて DNA を巻き取った。ガラス棒に巻き取った DNA を 70 %、80 %、90 %、99.5 % のエタノールに浸して、洗浄した。この操作は DNA を巻きとる際の母液が透明になるまで行い、これを精製 DNA として以後の実験に用いた。

#### 1.3.3.2. G+C 含量の測定

G+C 含量の測定は Tamaoka と Komagata (1984) に従って行った。DNA 溶液を 100°C で 10 分間加熱後、急冷し、溶液中の DNA を一本鎖 DNA とした。これに、ヌクレアーゼ P1 (DNA-GC Kit, Yamasa Shoyu, Chiba) を加えて、50°C で 1 時間インキュベートし、さらにアルカリフォスファターゼ (Sigma P-4252) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートし、一本鎖 DNA をデオキシリボヌクレオシドに分解した。反応溶液中のデオキシリボヌクレオシドの測定には HPLC を用いた。HPLC は Shimadzu model LC-6A Liquid Chromatograph を用い、カラムは COSMOSIL packed column 5C18 (4.6 X 150 mm)、検出器は SPD-6A UV spectrophotometric detector、またデータの解析には Shimadzu Chromatopack C-R4A model を用いた。カラム温度は室温で行い、移動相は 20 mM リン酸水素アンモニウム:アセトニトリル (20:1, vol/vol)、1 ml/min とし、270nm での吸光度を検出した。ピークの同定は、DNA-GC Kit 中の 4 種類のヌクレオチドの等モル混合物をアルカリフォスファターゼによって加水分解したものを標準として用い、保持時間により行った。

#### 1.3.4. DNA-DNA 交雑実験

##### 1.3.4.1. 核 DNA の抽出および精製

核 DNA の抽出および精製は前項 1.3.3.1. に述べた方法で行った。

##### 1.3.4.2. DNA-DNA 交雑実験

DNA-DNA 交雑実験は Hamamoto と Nakase (1995) の方法に従い、メンブレンフィルターを用いて行った。

フィルターに固定する DNA は所定濃度の DNA 溶液を 100°C で 10 分間加熱後、急冷して一本鎖 DNA とし、10XSSC を加えて、最終濃度 30 μg/ml の 2X SSC 溶液に調製した。この DNA 溶液 1 ml を濾過器を用いて、ポアサイズ 0.45 μm、直径 24 mm のニトロセルロースフィルター (NC 45, Schleicher & Schuell, Darmstadt, Germany) 上に一本鎖 DNA を捕集した。一晩、風乾の後、真空オーブンを用いて、90°C で 4 時間焼き付け、固定を行った。プローブ DNA は Nick translation kit N-5000 (Amersham International plc., Buckinghamshire, UK) を用いて <sup>3</sup>H ([1', 2', 5-<sup>3</sup>H] cytidine 5'-triphosphate, Amersham International plc.) でラベルした。DNA-DNA 交雑実験用プローブ溶液は、所定量のプローブ DNA を 100°C で 10 分間加熱、急冷後、10% SDS および 20X SSC を加えて、最終濃度 0.1% の SDS を含む、2X SSC 溶液となるよう調製した。バイアルの中に固定化したフィルターを 1 枚ずつ入れ、調製したプローブ溶液を 1 ml を加えてふたをし、40-48 時間反応させた。反応温度は (1X SSC 溶液での T<sub>m</sub>-25)°C とした。

反応終了後、室温にもどしたフィルターを 2X SSC 溶液をいれた 2 個のビーカーに順次浸して軽く洗い、さらに濾過器上で 2X SSC 溶液 2 ml で 2 回、次に、1 ml、次いで 5 ml の 5mM Tris 溶液 (pH 無調整) で洗浄して未反応のプローブを取り除いた。洗浄後のフィルターを赤外線ランプ下で乾燥させ、シンチレーションカウンターを用いて、フィルター上に固定化された DNA と交雑したプローブの <sup>3</sup>H をカウントした。

供試株間の DNA の相同性は、DNA-DNA 交雑実験の結果に基づき、
$$\text{relative binding (\%)} = \left[ \frac{\text{cpm of heterologous filter}}{\text{cpm of homologous filter}} \right] \times 100$$
を用いて計算した。すべて実験はフィルターを 3 枚ずつ用いて行い、計算には 3 枚のフィルターの平均値を用いた。

#### 1.4. 系統学的手法

18S rDNA および ITS 領域の塩基配列の決定、アラインメントおよび系統樹の作成は、第二章第二節の方法により行った。

## 2. 結果と考察

Table 4.2. Ballistoconidium-forming yeasts isolated from leaves in Thailand

Scientific name	No. of strains		
	1987	1990	
<i>Bullera alba</i>	1		
<i>Bullera crocea</i>	8	2	
<i>Bullera pseudoalba</i>	4	3	
<i>Bullera sinensis</i>	11	30	
<i>Bullera variabilis</i>	5		
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>		8	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	6	2	
<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	10	13	
Subtotal	45	58	
<i>Kockovaella thailandica</i>	2	2	
<i>Kockovaella imperatae</i>	1		
<i>Bensingtonia</i> sp.		1	K-304
<i>Bullera</i> sp.		1	K-272
<i>Kockovaella</i> sp.		1	K-337
<i>Sporobolomyces</i> sp. 1	1		K-41
<i>Sporobolomyces</i> sp. 2	2		K-77, K-81
<i>Sporobolomyces</i> sp. 3	1		K-105
<i>Sporobolomyces</i> sp. 4	7	1	K-17, K-19, K-90, K-91, K-92, K-93, K-109, K-383
<i>Sporobolomyces</i> sp. 5		1	K-230
<i>Sporobolomyces</i> sp. 6		8	K-316, K-332, K-335, K-344, K-346, K-353, K-354, K-362
<i>Tilletiopsis</i> sp. 1	1		K-95
<i>Tilletiopsis</i> sp. 2	1		K-125
<i>Tilletiopsis</i> sp. 3	1		K-132
<i>Tilletiopsis</i> sp. 4	1		K-139
Subtotal	18	15	
Total	63	73	

射出胞子の形態、有柄分生子の有無、生理生化学性状および化学分類学的性状に基づく同定の結果は Table 4.2 に示したとおりである。1987 年分離の 63 株は 17 グループにわけられ、このうち 7 グループは *Bullera alba*、*B. crocea*、*B. pseudoalba*、*B. sinensis*、*B. variabilis*、*Sporobolomyces salmonicolor* および *S. shibatanus* と同定された。1990 年分離の 73 株は 13 グループに分けられ、このうち 6 グループは *B. crocea*、*B. pseudoalba*、*B. sinensis*、*Sporidiobolus ruineniae*、*Sporobolomyces salmonicolor* および *S. shibatanus* と同定された。また、同定できなかったグループについては、さらに分類学的研究を行い、2 グループ 3 株(いずれも 1987 年分離株)については既に *Kockovaella thailandica* (Nakase et al., 1991) および *Kockovaella imperatae* (Nakase et al., 1991) として報告されている。その後、1990 年分離株の内、1 グループ 2 株は *K. thailandica* と同定された。これら同定結果と、残り 13 グループ 28 株の分類学的位置について以下に記す。

## 2.1. *Bensingtonia* 属

### 2.1.1. *Bensingtonia musae* Takashima, Suh et Nakase

Strain: K-304

Strain K-304 は生理生化学性状の比較から既知の種と同定できなかった。本菌株は菌体にキシロースを含まず、主要ユビキノンが Q-9 であることから、*Bensingtonia* 属に属すると推定された。*Bensingtonia* sp. K-304 と *Bensingtonia* 属の既知種 9 種の生理生化学試験の結果を、NTSYS-pc (Rohoff, 1990) を用いて比較したところ、本菌株は *B. intermedia* および *B. ingoldii* と類似度が高かった (Fig. 4.1)。*Bensingtonia* sp. K-304 の DNA を上記 1.3.3.a 方法によって調製し、G+C 含量を決定したところ、52.3 mol% で、*B. naganoensis* および *B. yamatoana* と類似した値を示した (Fig. 4.1)。そこで、生理生化学的性状の類似度が高かった *B. intermedia* および *B. ingoldii*、および G+C 含量の類似していた *B. naganoensis* および *B. yamatoana* の計 4 株との DNA-DNA 交雑実験を行ったところ、*Bensingtonia* sp. K-304 はこれら 4 株とは 4-15 % と低い DNA 相同値を示した (Table 4.3)。この結果から、既知の種とは別の種であることが確認されたので、本菌株を基に、新種 *Bensingtonia musae* Takashima, Suh et Nakase を提案した (Takashima et al. 1995b)。本菌株は *B. musae* として JCM に登録し、その登録番号は JCM 8801 である。

Table 4.3. DNA relatedness among *Bensingtonia* sp. K-304 and phenotypically similar *Bensingtonia* species

Species	Strain	%relative binding of DNA from	
		K-304	JCM 5291
<i>Bensingtonia</i> sp.	K-304	100	7
<i>Bensingtonia ingoldii</i>	JCM 7445	15	8
<i>Bensingtonia intermedia</i>	JCM 5291	5	100
<i>Bensingtonia naganoensis</i>	JCM 5978	8	7
<i>Bensingtonia yamatoana</i>	JCM 2896	4	14

*Bensingtonia musae* は *B. ingoldii* とは sucrose, cellobiose, lactose, melezitose, soluble starch および nitrate の資化性によって、また、*B. intermedia* とは cellobiose, L-arabinose, erythritol および salicin の資化性、および *p*-aminobenzoic acid および pyridoxine の要求性によって容易に区別できる (Table 4.4)。



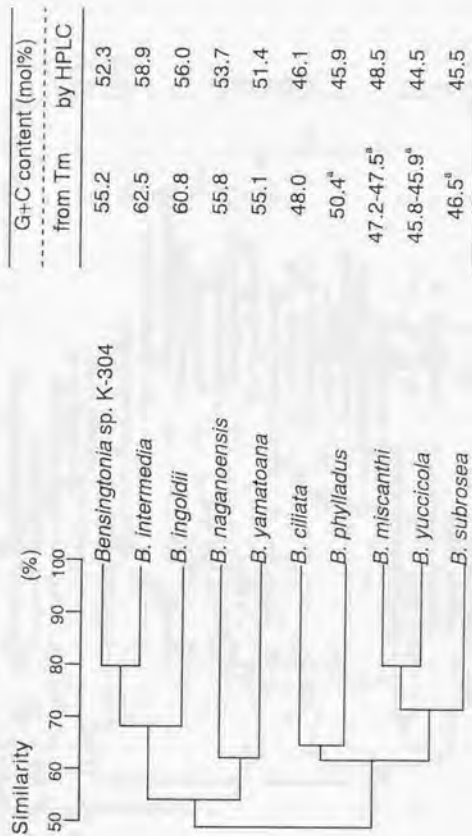


Fig. 4.1. Dendrogram based on the physiological and biochemical characteristics among *Bensingtonia* sp. K-304 and type strains of the genus *Bensingtonia*.

The similarity value was calculated using SIMQUAL in NTSYS-pc (Rohlf, 1990). Clustering was performed by UPGMA using SAHN in NTSYS-pc.

<sup>a</sup>, Boekhout and Nakase (1988a).

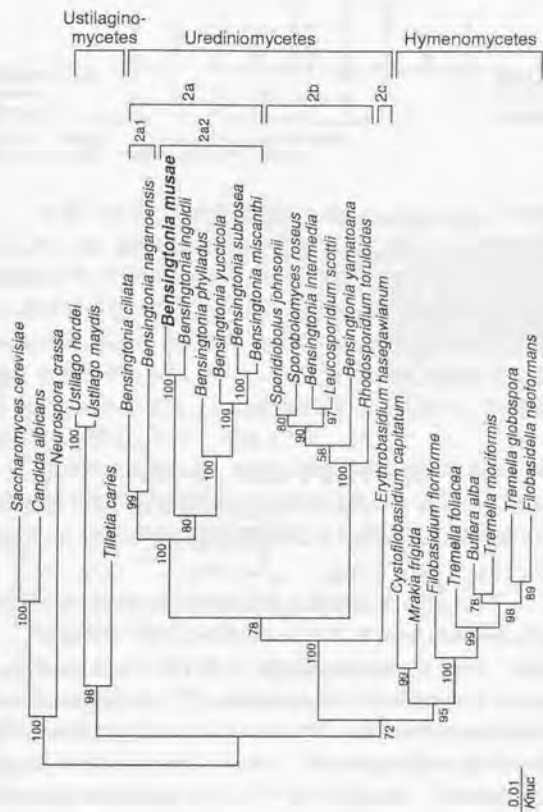


Fig. 4.2. Phylogenetic tree of *Bensingtonia musae* and related species based on 18S rDNA sequences. The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1561 positions, using the neighbor-joining method (Saltou and Nel, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the percentages from 1,000 replicate bootstrap sampling.

Table 4.4. Salient characteristics of *Bensingtonia musae*, *B. ingoldii* and *B. intermedia*

	Carbon assimilation											Soluble starch	D-Xylose	L-Arabinose	D-Arabinose	D-Ribose	
	Galactose	L-Sorbose	Sucrose	Cellobiose	Trehalose	Lactose	Melibiose	Raffinose	Melzitrose								
<i>Bensingtonia musae</i>	LW/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	L	L	+
<i>B. ingoldii</i> <sup>1)</sup>	LW	LW/-	+	+	+	-	LW	LW	+	-	+	+	+	L	LW/-	LW	+
<i>B. intermedia</i> <sup>2)</sup>	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	L	-

	Carbon assimilation					Nitrogen assimilation			Vitamins required		
	Erythritol	Ribitol	Glucitol	Salicin	Glucono- $\delta$ -lactone	Succinic acid	Citric acid	Nitrate	L-Lysine		
<i>Bensingtonia musae</i>	+	+	+	+	+	LW	W	-	+	PABA, Pyridoxine, Thiamine	
<i>B. ingoldii</i> <sup>1)</sup>	+	+	W	W	+	W	W	+	+	PABA, Pyridoxine, Thiamine	
<i>B. intermedia</i> <sup>2)</sup>	-	L	+	-	L	+	+	-	L	Thiamine	

+, positive; -, negative; L, latent; W, weak; LW, latent & weak.

<sup>1)</sup> Nakase et al. (1989). <sup>2)</sup> Nakase and Suzuki (1985b).

新種であることが確認された *Bensingtonia musae* の系統学的位置を考察するため、18S rDNA 塩基配列を第二章第二節 1.2.a の方法によって決定した。関連菌類とのアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 4.2)。図中に示したクラスターの番号は、第二章第二節に示した通りである。*Bensingtonia musae* は、分子系統的には生理生化学的性状が類似していた *B. ingoldii* と近縁であった。しかしながら、同様に生理生化学的性状が類似していた *B. intermedia* とは異なった系統枝に位置しており、生理生化学的性状は系統を必ずしも反映しないことが示された。

本実験の結果から、生理生化学的性状の類似度の高さが、必ずしも系統的な類縁性を示すものではないことが示されたため、これ以降は、供試株の類縁種の推定を、18S rDNA の塩基配列による系統関係に基づいて行うこととした。

*Bensingtonia musae* Takashima, Suh et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae ovoideae, ellipsoidales, elongatae aut cylindraceae, (1.6-2.4) x (5.4-12.6)  $\mu$ m, singulae aut binae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, pellicula fragilis et incompleta, et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura olivaceo-flava aut atrofava, glabra aut rugosa, butyracea, margine erosa. Pseudomycelium primitivum formatur. Ballistosporae reniformes, (1.6-3.3) x (5.0-7.5)  $\mu$ m. Fermentatio nulla. Glucosum, L-sorbosum, trehalosum, D-xylosum, L-arabiosum (lente), D-arabiosum (lente), D-ribosum, ethanolum, glycerolum, erythritolum, ribitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, salicinum, glucono- $\delta$ -lactonum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum (lente), acidum succinicum (lente et

exiguum) et acidum citricum (exiguum) assimilantur at non galactosum (vel lente et exiguum), saccharosum, maltosum, cellobiosum, lactosum, melibiosum, raffinose, melezitosum, inulinum, amyllum solubile, L-rhamnosum, galactitolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, acidum DL-lacticum nec inositolum. Ammonium sulfatum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non kalium nitricum nec natrium nitrosium. Maxima temperatura crescentiae: 31-32°C. Ad crescentiam acidum p-aminobenzonicum, pyridoxinum et thiaminum necessarium sunt. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 52.3 mol% (per HPLC), 55.2 mol% (ex Tm). Ubiquinonum majus: Q-9. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Musae paradisiacae*, JCM 8801 (originaliter ut K-304) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal, ellipsoidal, elongate or cylindrical, (1.6-2.4) x (5.4-12.6)  $\mu$ m, single or in pairs (Fig. 4.3). A sediment is formed. After one month at 17°C, an incomplete fragile pellicle and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is olive yellow to dark yellow (carry yellow), dull, smooth to delicate by wrinkled, butyous, and has an erose margin.

On Dalmau plate culture on corn meal agar, primitive pseudomycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are kidney-shaped, (1.6-3.3) x (5.0-7.5)  $\mu$ m (Fig. 4.3).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, L-sorbose, trehalose, D-xylose, L-arabinose (latent), D-arabinose (latent), D-ribose, ethanol, glycerol, erythritol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol, salicin, glucono- $\delta$ -lactone, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid (latent), succinic acid (latent and weak), and citric acid. Does not assimilate galactose (latent and weak), sucrose, maltose, cellobiose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, L-rhamnose, galactitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, DL-lactic acid, or inositol.

Assimilates ethylamine hydrochloride, L-lysine hydrochloride, and cadaverine dihydrochloride. Does not assimilate potassium nitrate, or sodium nitrite.

Maximum growth temperature is 31-32°C.

p-Aminobenzoic acid, pyridoxine and thiamine are required for growth.

No starch-like substances are produced.

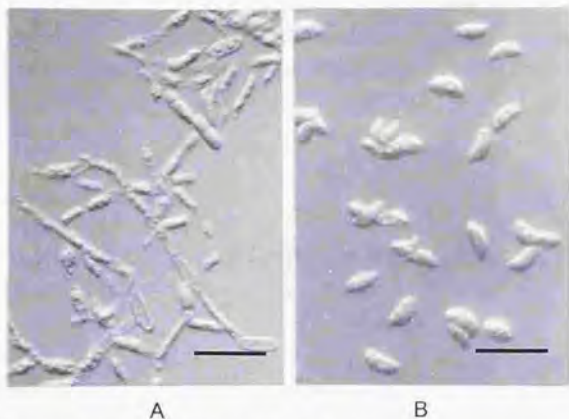


Fig. 4.3. *Beringtonia musae* (K-304 = JCM 8801T).  
A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 5 days at 25 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 52.3 mol% (by HPLC) and 55.2 mol% (from Tm).

The major ubiquinone is Q-9.

Xylose is absent in the cells.

The type strain of *B. musae* K-304, was isolated from a dead leaf of *Musa paradisiaca* collected by T. Nakase in Dec. 1990, Thailand. This strain has been deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama as JCM 8801.

## 2.2. *Bullera* 属

### 2.2.1. *Bullera alba* (Hanna) Derx

Strain: K-29

K-29 は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *B. alba* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.5 に示した。

### 2.2.2. *Bullera crocea* Buhagiar

Strains: K-27, K-39, K-84, K-85, K-99, K-114, K-117, K-122, K-204, K-274

上記 10 株は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *B. crocea* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.5 に示した。

### 2.2.3. *Bullera pseudoalba* Nakase et Suzuki

Strains: K-15, K-54, K-87, K-100, K-203, K-297, K-336

上記 7 株は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *B. pseudoalba* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.5 に示した。

### 2.2.4. *Bullera sinensis* Li

Strains: K-3, K-52, K-53, K-59, K-62, K-76, K-79, K-101, K-111, K-119, K-123, K-233, K-242, K-243, K-244, K-255, K-259, K-271, K-273, K-279, K-281, K-285, K-292, K-302, K-305, K-322, K-327, K-328, K-331, K-338, K-339, K-342, K-345, K-349, K-351, K-368, K-369, K-373, K-379, K-389, K-408

上記 41 株は K-59, K-76, K-79 および K-101 を除く 37 株は、射出胞子

Table 4.5. *Bullera* species isolated from leaves in Thailand and their characteristics

Species	<i>B. alba</i>	<i>B. crocea</i>	<i>B. pseudoalba</i>	<i>B. sinensis</i>	<i>B. variabilis</i>
No. of strain examined	1	10	7	41	5
Assimilation of carbon compounds					
Glucose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-/S/LW/L	-/LW	V	-
Sucrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+/S	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Lactose	+	V	V	-	-
Melibiose	+	+	-	+	+
Raffinose	+	+	+/S	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-/LW	-	-
Soluble starch	+	W+/LW	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+/L	+/L/S	+/W/S	+/L
D-Ribose	+	+/L/S/W	+/LW	+/LW	+/L/LW
L-Rhamnose	+	+	+/S	+	+
Ethanol	-	-	-/LW/L/S	-/L	-
Glycerol	LW	-/LW	+/S	+/LW	-/LW
Erythritol	LW	-/LW	-	+	-
Ribitol	+	V	LW/S/L/-	-/LW/W	-
Galactitol	+	+/S/LW	+	+/L	V
D-Mannitol	+	V	+/S	+	V
D-Glucitol	+	-	V	V	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	L	S/L+/LW	L/LW/-	+/L	+/L/LW
Salicin	+	LW+/W	+/LW	+/S/L	+/W/LW
Glucono- $\delta$ -lactone	+	+/L/S/LW	+	+	+W
2-Ketogluconic acid	+	+	+/L	+	+
5-Ketogluconic acid	+	+	+/S	+	+
DL-Lactic acid	-	-/W/LW	-	-	-
Succinic acid	+	W+	+/LW	+W	+W
Citric acid	W	W/LW/-	V	+W	-/LW
Inositol	+	-/LW/W	+	+	+
D-Glucuronic acid	+	+	+	+	+
D-Galacturonic acid	+	+	+	+	n
Assimilation of nitrogen compounds					
Ammonium sulfate	+	+	+	+	+
Potassium nitrate	-	-	-	-/LWW	-
Sodium nitrite	-	+	V	-W/LW	LW/L+
Ethylamine-hydrochloride	+	+	+	+	V
L-Lysine-hydrochloride	+	+	+	+	+
Cadaverine-dihydrochloride	+	-	+	+	V
Starch formation	-(?)	+W	+	+	V
Vitamines required	n	Thiamine	Thiamine	Thiamine	n

+, positive; -, negative; w, weak; s, slow; L, latent; LW, latent and weak; V, variable; n, no data.

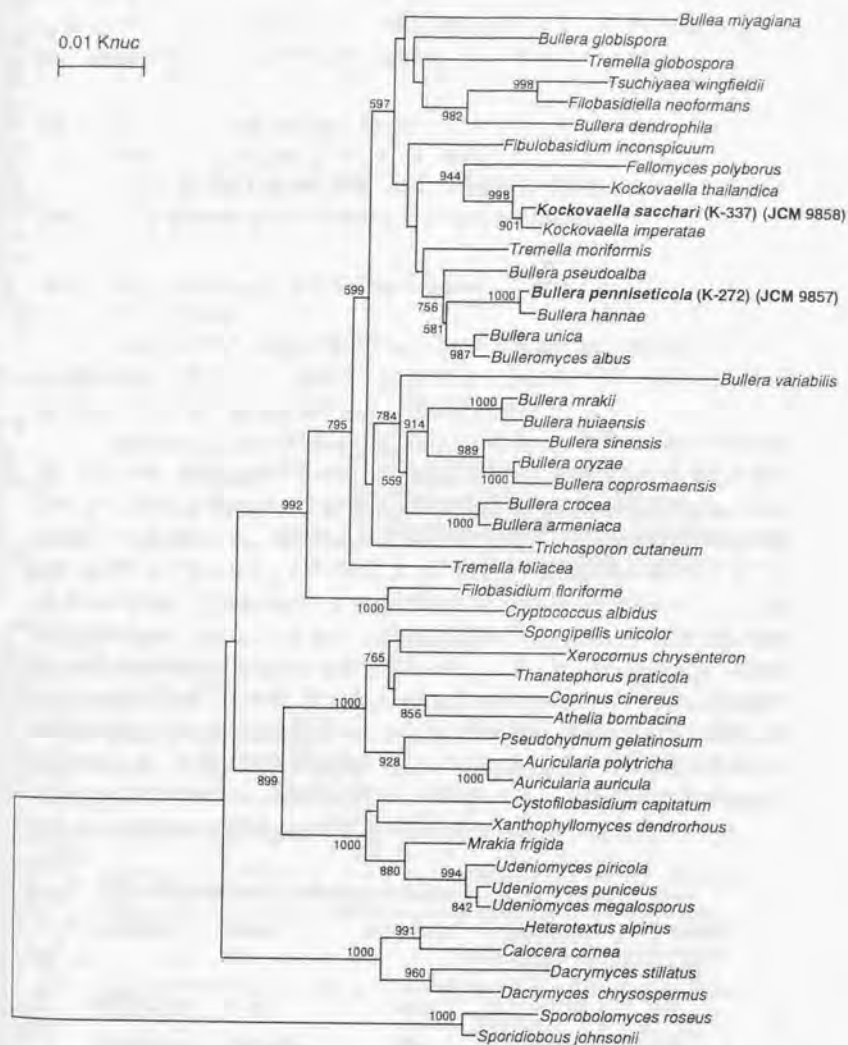


Fig. 4.4. Phylogenetic tree of *Bullera*, *Kockovaella*, *Udeniomyces* and related taxa based on 18S rDNA sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1,509 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the percentages from 1000 replicate bootstrap sampling.



の形態、および生理生化学性状から *B. sinensis* と同定した。また、K-59、K-76、K-79 および K-101 の 4 株は、DNA-DNA 交雑実験の結果、*B. sinensis* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.5 に示した。

#### 2.2.5. *Bullera variabilis* Nakase et Suzuki

Strains: K-80, K-121, K-129, K-140, K-152

上記 5 株は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *B. variabilis* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.5 に示した。

#### 2.2.6. *Bullera penniseticola* Takashima et Nakase

Strain: K-272

Strain K-272 は生理生化学性状の比較から既知の種と同定できなかった。本菌株は菌体にキシロースを含み、主要ユビキノンは Q-10 で、有柄分生子を形成しないことから、*Bullera* 属に属すると推定された。

*Bullera* sp. K-272 の DNA を上記 1.3.3.b によって調製し、G+C 含量を決定したところ、44.2 mol% であった。既に報告されている種の G+C 含量と比較すると、この値は、*B. hanna*e および *B. hui*aensis の 2 種 (Hamamoto and Nakase, 1996) と類似した値であった。本菌株の系統学的位置を推定するため、18S rDNA の塩基配列を第二章第二節 1.2.b の方法によって決定し、関連菌株とあわせてアライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 4.4)。*Bullera* sp. K-272 は系統的には *B. hanna*e JCM 8937 と近縁な関係を示し、また、両者の 18S rDNA 塩基配列の類似度は 99.6% と非常に高かった。一方、*B. hui*aensis JCM 8933 は別の系統枝に位置していた。そこで、*Bullera* sp. K-272 および *B. hanna*e JCM 8937 の間の DNA-DNA 交雑実験を行ったところ、両者の DNA 相同値は 23-26% (Table 4.6) であった。この結果から *Bullera* sp. K-272 は *B. hanna*e とは別種であることが明らかとなったので、本菌株を基に、新種 *Bullera penniseticola* Takashima et Nakase (Takashima and Nakase, 1998) を提案した。

Table 4.6. DNA-DNA relatedness of *Bullera* sp. K-272 and *B. hanna*e

Species	Strain	G+C mol%	% relative binding of DNA from	
			K-272	JCM 8937
<i>Bullera</i> sp.	K-272	44.2	100	23
<i>B. hanna</i> e	JCM 8937	45.3	26	100

本菌株は JCM に登録し、その番号は JCM 9857 である。また、*B. penniseticola* JCM 9857 の 18S rDNA 塩基配列は DDBJ に登録し、その登録番号は

AB005452 である。

*Bullera* 属には現在 15 種が認められている。Suh と Nakase (1995) および Suh ら (1996a) はこれら 15 種の基準株の 18S rDNA 塩基配列を決定し、系統関係を調べ、本属は heterogeneous であると指摘している。また、報告されている種の G+C 含量が 39-62 mol% と非常に広いことも、この属の heterogeneity を裏付けるものである。

タイの植物から分離した射出胞子形成酵母 *Bullera penniseticola* の G+C 含量は、*B. hanna*e および *B. huiaensis* の 2 種 (Hamamoto and Nakase, 1996) と類似した値を示したが、系統的には、*B. hanna*e と近縁で、*B. huiaensis* とは別の系統枝に位置した。*B. penniseticola* は生理生化学的性質も *B. hanna*e とよく類似しているが、生育最高温度の違いにより、両者は識別可能である (Table 4.7)。

Table 4.7. Differential characteristics of *Bullera penniseticola* and *B. hanna*e

Species	Strain	Assimilation of		Max Growth Temp. (°C)
		Salicin		
<i>Bullera penniseticola</i>	JCM 9857	LW	30-31	
<i>Bullera hanna</i> e*	JCM 8937	—	22-23	

LW, latent and weak; —, negative.

\* Hamamoto and Nakase (1996).

*Bullera penniseticola* Takashima et Nakase, sp. nov.

In 'YM', post dies 5 ad 25°C, cellulae vegetativae ovoideae, ellipsoidales aut elongatae, (2.0-4.0) x (3.3-10.1) μm, singulae aut binae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, annulus imperfectus, insulae et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura subflava, glabra, nitida, mollis et margine glabra. Mycelium et pseudomycelium non formantur. Ballistosporeae globosae vel napiformes, (2.4-3.5) x (2.6-4.1) μm. Fermentatio nulla. Glucosum, galactosum, saccharosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, lactosum, melibiosum, raffinose, melezitosum, amyllum solubile, D-xylosum, L-arabiosum, D-arabiosum, D-ribosum, L-rhamnosum (lente), glycerolum (lente), ribitolum (lente et exiguum), galactitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum (lente et exiguum), glucono-δ-lactonum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum succinicum (exiguum), acidum citricum (exiguum) et inositolum assimilantur at non L-sorbosum, inulinum, ethanolum, erythritolum nec acidum DL-lacticum. Kalium nitricum, natrium nitrosum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum non assimilantur. Maxima temperatura crescentiae: 30-31°C. Ad crescentiam thiaminum necessarium est. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 44.2 mol% (per HPLC). Ubiquinorum majus: Q-10. Xylosum

in cellulis praesens. Holotypus: Isolatus ex folio *Pennisetum* species, JCM 9857 (originaliter ut K-272) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 5 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal, ellipsoidal or elongate, (2.0-4.0) x (3.3-10.1)  $\mu\text{m}$ , single or in pairs (Fig. 4.5). A sediment is formed. After one month at 17°C, an incomplete ring, islets and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is pale yellow, shining, smooth and delicately wrinkled near the bottom, and has an entire margin.

On Dalmau plate culture on corn meal agar, mycelia and pseudomycelia are not observed.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are globose to napiform, (2.4-3.5) x (2.6-4.1)  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.5).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, galactose, sucrose, maltose, cellobiose, trehalose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose (slow), glycerol (latent), ribitol (latent and weak), galactitol, D-mannitol, D-glucitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, salicin (latent and weak), glucono- $\delta$ -lactone, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, succinic acid (weak), citric acid (weak), and inositol. Does not assimilate L-sorbose, inulin, ethanol, erythritol, or DL-lactic acid.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, L-lysine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 30-31°C.

Thiamine is required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 44.2 mol% as determined by HPLC.

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is present in the cells.

The type strain of *B. penniseticola*, K-272, was isolated by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1990 from a leaf of *Pennisetum* sp. collected along the southeast

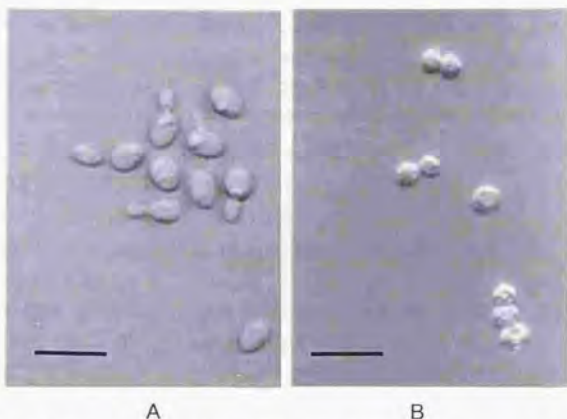


Fig. 4.5. *Bullera penniseticola* (K-272 = JCM 98571<sup>T</sup>). A: Vegetative cells grown in YM broth for 5 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 5 days at 25 °C. Scales = 10 µm.

seacoast of Bangkok, Thailand. This strain has been deposited in Japan Collection of Microorganisms (JCM), Wako, Saitama as JCM 9857.

### 2.3. *Kockovaella* 属

*Kockovaella* 属は、Nakase ら (1991)によって、タイで採集したイネ (*Oryza sativa* L.)および *Imperata cylindrica* (L.) Beauv の葉から分離した3株の射出胞子形成酵母に基づいて設立された属である。射出胞子、出芽、および有柄分生子の3種類の増殖形態を示すことが特徴で、菌体にキシロースを含み、主要ユビキノンは Q-10 である。*Kockovaella* 属は系統学的には菌蕈綱に位置し、*Bullera* 属と近縁である (Suh et al., 1996c)。射出胞子の形は対称形を示すものが多いが、非対称形を示すものもある (Canete-Gibas et al., 1998; Nakase et al., 1991; Takashima and Nakase, 1998)。菌蕈綱に位置し、*Mrakia* 属や *Cystofilobasidium* 属に近縁の *Udeniomyces* 属は、非対称形の大きい射出胞子を形成する。一方、*Kockovaella* 属の射出胞子は *Udeniomyces* 属のものほどは大きくなく、*Bullera* 属のそれとほぼ同じ大きさである。

#### 2.3.1. *Kockovaella imperatae* Nakase, Banno et Yamada

Strain: K-97

本菌株は Nakase ら (1991)が、*Kockovaella* 属を設立する際に用いた3株の内の1株である。生理生化学性状を、Table 4.8 に示した。

#### 2.3.2. *Kockovaella thailandica* Nakase, Banno et Yamada

Strains: K-35, K-94, K-308, K-311

K-35 および K-94 の2株は、*Kockovaella* 属設立の際の供試株3株の内の2株である。また、K-308 および K-311 は1990年の分離株で、DNA-DNA 交雑実験により、*K. thailandica* と同定した。生理生化学性状を、Table 4.8 に示した。

#### 2.3.3. *Kockovaella sacchari* Takashima et Nakase

Strain: K-337

Strain K-337 は生理生化学性状の比較から既知の種と同定できなかった。本菌株は菌体にキシロースを含み、主要ユビキノンは Q-10 で、有柄分生子を形成することから、*Kockovaella* 属に属すると推定された。

*Kockovaella* sp. K-337 の核 DNA を上記の方法 1.3.3.b によって調製し、G+C 含量を決定したところ、48.0 mol%であった。これは、既に報告されている *Kockovaella* 属の2種とほぼ同じであった。本菌株および *K. imperatae* の18S rDNA の塩基配列を第二章第二節 1.2.b の方法によって決定し、既に報告されている、*K. thailandica* および関連菌株の塩基配列と併せてアラインメントの後、

Table 4.8. *Kockovaella* species isolated from leaves in Thailand and their characteristics

Species	<i>K. imperatae</i>	<i>K. thailandica</i>
No. of strain examined	1	4
Assimilation of carbon compounds		
Glucose	+	+
Galactose	+	+
L-Sorbose	LW/-	L/LW/-
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Cellulose	+	+
Trehalose	+/L	+
Lactose	+	+
Melibiose	+	+
Raffinose	L/+	+
Melzitose	+	+
Inulin	-	-
Soluble starch	+	+
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Arabinose	L+/LW/S	V
D-Ribose	+	+
L-Rhamnose	V	+
Ethanol	-	-
Glycerol	-	-LW
Erythritol	-	-
Ribitol	LW/-	-LW
Galactitol	+/LW/L	-
D-Mannitol	+	+
D-Glucitol	V	V
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	-L/LW
Salicin	+/LW/L	-W
Glucono- $\delta$ -lactone	V	-
2-Ketogluconic acid	V	V
5-Ketogluconic acid	-W/LW	V
DL-Lactic acid	-	-
Succinic acid	+/L/LW	W/+
Citric acid	LW	W/LW/-
Inositol	LW/-	L/-LW
D-Glucuronic acid	+S	+
D-Galacturonic acid	+S	+
Assimilation of nitrogen compounds		
Ammonium sulfate	+	+
Potassium nitrate	-	-
Sodium nitrite	-	-
Etylamine-hydrochloride	-	-
L-Lysine-hydrochloride	+	+
Cadaverine-dihydrochloride	-	-LW/LW
Starch fermentation	-	-
Vitamines required		
	Thiamine	Thiamine

+, positive; -, negative; w, weak; s, slow; L, latent; LW, latent and weak; V, variable.

近隣結合法により系統樹を作成した(Fig. 4.4)。 *Kockovaella* sp. K-337 は *K. thailandica* および *K. imperatae* の既知の2種と系統枝を形成した。そこで、本菌株と既知の2種の基準株を用いて、これら3株の間のDNA-DNA交雑実験を行ったところ、DNA相同値は5-15%であった (Table 4.9)。この結果から、既知の種とは別の種であることが確認されたので、新種 *Kockovaella sacchari* Takashima et Nakase (Takashima et Nakase, 1998)を提案した。

Table 4.9. DNA-DNA relatedness of *Kockovaella* sp. K-337 and other *Kockovaella* species.

Species	Strain	G+C mol%	% relative binding of DNA from		
			K-337	JCM 7824	JCM 7826
<i>Kockovaella</i> sp.	K-337	48.0	100	5	12
<i>Kockovaella thailandica</i>	JCM 7824	47.5	15	100	13
<i>Kockovaella imperatae</i>	JCM 7826	47.7	12	8	100

本菌株は JCM に登録し、その登録番号は JCM 9858 である。また *K. sacchari* JCM 9858 および *K. imperatae* JCM 7826 の 18S rDNA 塩基配列は DDBJ に登録し、その登録番号は AB005453 および AB005561 である。*Kockovaella sacchari* は *Kockovaella* 属の既知の2種と生理生化学性状も類似しているが、*K. thailandica* とは galactitol, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid の資化性により、また *K. imperatae* とは  $\alpha$ -methyl-D-glucoside の資化性により識別可能である (Table 4.10)。

Fig. 4.6 に *Kockovaella* 属菌株間の ITS 塩基配列のアラインメントを DNA-DNA 交雑実験の結果と共に示した。*K. thailandica* 4株は ITS1 および ITS2 とともに同一の配列であった。一方、*K. imperatae* および *K. sacchari* は *K. thailandica* とは異なった、それぞれ固有の配列を示した。*K. imperatae* および *K. sacchari* は未だ1株ずつしか分離されていないが、*Kockovaella* 属3種間では ITS 領域に図に示したような配列の違いが見られ、本領域の塩基配列に基づく識別が可能であると思われる。

[ITS1]

K.thai.7824 GTGATTGCG-CGAAAGGCCTCTAAATCCAATCCTCTACACCTGTGAACCTGTGCGTGGGC  
 K.thai.7825 .....  
 K.thai.K308 .....  
 K.thai.K311 .....  
 K.impe.7826 .....T..C.....T.--.....A.....C.....A.  
 K.sacc.9858 .....GT..C...A..T.--.....A.....

K.thai.7824 CTGTGCCCGCCGGTCTTTACAACACTAT-TGTCATGAACGGTGAATGATTTATAACAAA  
 K.thai.7825 .....  
 K.thai.K308 .....  
 K.thai.K311 .....  
 K.impe.7826 ..CG.T.....T...G.....  
 K.sacc.9858 T.CG.....T...G.....

K.thai.7824 ACA  
 K.thai.7825 ...  
 K.thai.K308 ...  
 K.thai.K311 ...  
 K.impe.7826 .--  
 K.sacc.9858 .T.

[ITS2]

K.thai.7824 GAAATCTCAATCCCCGAGGGTTTTTCTGGAACCCGGCGGACTTGGACTTGGGCGTCTG  
 K.thai.7825 .....  
 K.thai.K308 .....  
 K.thai.K311 .....  
 K.impe.7826 .....A.....AT.....A.T..T.....T..A..  
 K.sacc.9858 .....G.....AT.....T.T..T.-.....

K.thai.7824 CCTCGCAAGGCTCGCCTCAAATGACTTAGTGGTTGCTTCTTGACTCATGCCTGACSTAA  
 K.thai.7825 .....  
 K.thai.K308 .....  
 K.thai.K311 .....  
 K.impe.7826 .....A.....C.....C.....  
 K.sacc.9858 .....A.....C.....

K.thai.7824 TAAGTTTCGTCGCGCCGGTCTGAGGCCCGCTCATAACCCCAATCATTTGACA  
 K.thai.7825 .....  
 K.thai.K308 .....  
 K.thai.K311 .....  
 K.impe.7826 .....TT...T.....G.....  
 K.sacc.9858 .....T.....T.....

Species	% Relative binding of DNA from					
	JCM 7824	JCM 7825	K-308	K-311	JCM 7826	JCM 9858
K.thai.7824	100	110*	101	91	13	15
K.thai.7825		100*				
K.thai.K308	102		100	98		
K.thai.K311		102*	108	100		
K.impe.7826	8	33*	6	10	100	12
K.sacc.9858	5				12	100

Fig. 4.6. Alignment of ITS1 and ITS2 sequences of *Kockovaella* species with DNA relatedness value.

Abbreviations. K.thai.7824, *K. thailandica* JCM 7824; K.thai.7825, *K. thailandica* JCM 7825; K.thai.K308, *K. thailandica* K-308; K.thai.K311, *K. thailandica* K-311; K.impe.7826, *K. imperatae* JCM 7826; K.sacc.9858; *K. sacchari* JCM 9858.

\* Nakase et al. 1991



Table 4.10. Salient characteristics of *Kockovaella sacchari* and other *Kockovaella* species

Species	Strain	Assimilation of				
		Galactitol	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	Glucono- $\delta$ -lactone	2-Ketogluconic acid	5-Ketogluconic acid
<i>Kockovaella sacchari</i>	JCM 9858	L	+	W	-	-
<i>Kockovaella thailandica</i> *	JCM 7824, JCM 7825	-	L/-	-	+	+
<i>Kockovaella imperatae</i> *	JCM 7826	L	-	L	LW	LW

+, positive; L, latent; W, weak; LW, latent and weak; -, negative.

\* Nakase et al. (1991).

*Kockovaella sacchari* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 5 ad 25°C, cellulae vegetativae sphaerical vel ovoideae, (2.0-6.3) x (3.3-7.3)  $\mu$ m, singulae, binae, in catenis aut in fasciculis, propagantes formatione conidorum stipitatorum et gemmarum blasticarum. Conidia stipitata ex cellula conidiogena multilateraliter. Sedimentum formatum. Post unum mensem ad 17°C, anulus, insulae et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura griseo-flava, glabra, nitida, butyracea et margine glabra. Mycelium et pseudomycelium non formantur. Ballistospores globosae vel napiformes, (2.2-4.0) x (3.1-4.6)  $\mu$ m. Fermentatio nulla. Glucosum, galactosum, saccharosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, lactosum, melibiosum, raffinose, melezitose, amyli solubile, D-xylosum, L-arabiosum, D-arabiosum (lente), D-ribosum, L-rhamnosum (lente), ribitolum (lente), galactitolum (lente), D-mannitolum (lente), D-glucitolum (lente),  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, salicinum, glucono- $\delta$ -lactonum (exiguum), acidum succinicum (lente), acidum citricum (exiguum) et inositolum (lente et exiguum) assimilantur at non L-sorbosum, inulinum, ethanolum, glycerolum, erythritolum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum nec acidum DL-lacticum. L-Lysinum assimilatur at non kalium nitricum, natrium nitrosum, ethylaminum nec cadaverinum. Maxima temperatura crescentiae: 31-32°C. Ad crescentiam thiaminum necessarium est. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 48.0 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis praesens. Holotypus: Isolatus ex folio *Saccharum officinarum*, JCM 9858 (originaliter ut K-337) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 5 days at 25°C, the vegetative cells are spherical to ovoidal, (2.0-6.3) x (3.3-7.3)  $\mu\text{m}$ , single, in pairs or in clusters, reproduced by budding and stalked conidia (Fig. 4.7). Stalks develop multilaterally from a conidiogenous cell. A sediment is formed. After one month at 17°C, a complete ring and islets, and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is greyish yellow, shining, smooth, butyrous and has an entire margin.

On Dalmau plate culture on corn meal agar, mycelia and pseudomycelia are not formed.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are globose to napiform, (2.2-4.0) x (3.1-4.6)  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.7).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, galactose, sucrose, maltose, cellobiose, trehalose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (latent), D-ribose, L-rhamnose (latent), ribitol (latent), galactitol (latent), D-mannitol (latent), D-glucitol (latent),  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, salicin, glucono- $\delta$ -lactone (weak), succinic acid (latent), citric acid (weak), and inositol (latent and weak). Does not assimilate L-sorbose, inulin, ethanol, glycerol, erythritol, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, or DL-Lactic acid.

Assimilates L-lysine hydrochloride. Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 31-32°C.

Thiamine is required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 48.0 mol% as determined by HPLC.

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is present in the cells.

The type strain of *K. sacchari*, K-337, was isolated by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1990 from a leaf of *Saccharum officinarum* collected along the southeast seacoast of Bangkok, Thailand. This strain has been deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama as JCM 9858.

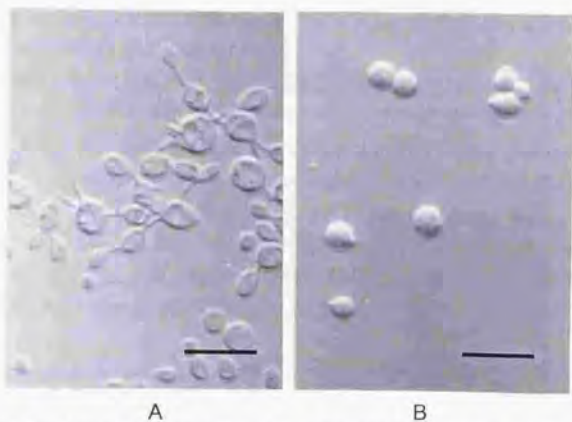


Fig. 4.7. *Kockovaella sacchari* (K-337 = JCM 9858T). A: Vegetative cells grown in YM broth for 5 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 5 days at 25 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

#### 2.4. *Sporidiobolus-Sporobolomyces* 属

タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の内、3グループ 39 株は射出胞子の形態と生理生化学性状によって、*Sporid. ruineniae*, *S. salmonicolor* および *S. shibatanus* と同定された。既知の種に同定できなかった株の内、10グループ 25 株は菌体にキシロースを含まず、主要ユビキノンが Q-10 であることから、*Sporobolomyces* 属または *Tilletiopsis* 属に属すると推定された。この 2つの属は、従来は形態学的性状によって区別されてきたが、第二章第二節にのべたように、*Sporobolomyces* 属がサビキン綱に含まれるのに対して、*Tilletiopsis* 属はクロボキン綱であり、系統的に異なっている。そこで、属の分類を明らかにすると共に、系統学的に近縁な種を見出すため、各グループの代表株の 18S rDNA 塩基配列を決定し、系統学的位置の推定を行った。

18S rDNA 塩基配列は、第二章第二節 1.2.c の方法により決定した。関連菌株とアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 4.8)。系統解析の結果から、K-41 (*Sporobolomyces* sp. 1), K-77 (*Sporobolomyces* sp. 2), K-105 (*Sporobolomyces* sp. 3), K-17 (*Sporobolomyces* sp. 4), K-230 (*Sporobolomyces* sp. 5) および K-335 (*Sporobolomyces* sp. 6) は *Sporobolomyces* 属に、また、K-95 (*Tilletiopsis* sp. 1), K-125 (*Tilletiopsis* sp. 2), K-132 (*Tilletiopsis* sp. 3) および K-139 (*Tilletiopsis* sp. 4) は *Tilletiopsis* 属であることが明らかとなった。以下、本項では、*Sporobolomyces* 属の種について述べる。

##### 2.4.1. *Sporidiobolus ruineniae* Holzschu, Tredick et Phaff

Strains: K-41 (*Sporobolomyces* sp. 1), K-261, K-262, K-276, K-286, K-289, K-300, K-325, K-334

上記の内、K-41 を除く 8 株は、射出胞子の形態、および生理生化学性状から *S. ruineniae* と同定した。また、K-41 (*Sporobolomyces* sp. 1) は、DNA の相同値から *S. ruineniae* と同定した。また、K-41 および関連菌株の DNA-DNA 交雑実験等については本項 2.4.4. に詳述した。DNA 相同性の比較からは、K-41 は *Sporid. ruineniae* の 2 つの変種、*Sporid. ruineniae* var. *ruineniae* (Fell and Statzell-Tallman, 1981) および *Sporid. ruineniae* var. *coprophilus* (Kurtzman and Fell, 1991) のどちらに属するかは決定できなかった。K-41 の生理生化学性状は *Sporid. ruineniae* var. *coprophilus* と一致していた。これらの菌株の内、K-41 は JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10220 である。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.11 に示した。

##### 2.4.2. *Sporobolomyces salmonicolor* Fell et Tallman

Strains: K-56, K-82, K-83, K-103, K-110, K-124, K-298, K-299

上記 8 株は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *S. salmonicolor*

Table 4.11. *Sporidiobolus-Sporobolomyces* species isolated from leaves in Thailand and their characteristics

Species	<i>Sporid. ruineniae</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>	<i>Sp. shibatanus</i>
No. of strains examined	9	8	23
Assimilation of carbon compounds			
Glucose	+	+	+
Galactose	+/S	-	-/LW
L-Sorbose	+/LW	+/L/S	L-/LW
Sucrose	+	+	+
Maltose	V	-/+	+
Cellobiose	V	-/+	V
Trehalose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Raffinose	+/W/S	+/W	+/W
Melezitose	-	-/S/+	+
Inulin	-	-	-
Soluble starch	-/W/LW	-/W	+
D-Xylose	+	+/L	-
L-Arabinose	V	-	-
D-Arabinose	LW/L/S/-	LW/-S/L	LW/-L
D-Ribose	V	LW/S/W	-/LW/L
L-Rhamnose	V	-	-
Ethanol	+	+/LW	-/LW/L
Glycerol	+	+/L	-/LW/L
Erythritol	-	-	-
Ribitol	+	+	-
Galactitol	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+/L/S/W
D-Glucitol	+	+	V
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-/LW	-/W	V
Salicin	V	V	V
Glucono- $\beta$ -lactone	+	+/W	+/W/S
2-Ketogluconic acid	-/+	-	-
5-Ketogluconic acid	-	-	-
DL-Lactic acid	-/LW	-	-
Succinic acid	V	LW/L/-	W/+LW/S
Citric acid	V	-	-/W
Inositol	-	-	-
D-Glucuronic acid	-	-	-
D-Galacturonic acid	-	-	-
Assimilation of nitrogen compounds			
Ammonium sulfate	+	+	+
Potassium nitrate	+	+	-
Sodium nitrite	+	+	-
Etylamine-hydrochloride	+	-/+	-/W
L-Lysine-hydrochloride	V	-	V
Cadaverine-dihydrochloride	-	-	-/LW/W
Starch formation	-	-	-
Vitamines required	Nil	Nil	Nil

+, positive; -, negative; w, weak; s, slow; L, latent; LW, latent and weak; V, variable.

Genus abbreviations: *Sporid.*, *Sporidiobolus*; *Sp.*, *Sporobolomyces*.

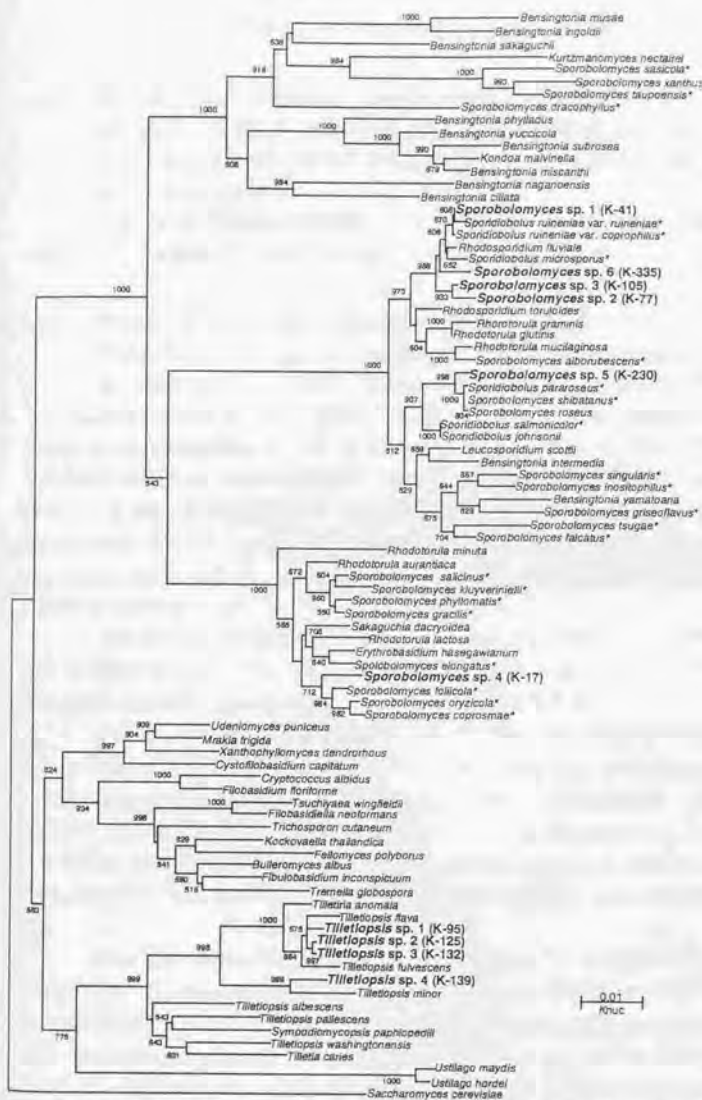


Fig. 4.8. Phylogenetic tree of *Sporidiobolus/Sporobolomyces-Tilletiopsis* spp. isolated from leaves in Thailand and related taxa based on 18S rDNA sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1526 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicates bootstrap sampling. \*, Hamamoto and Nakase, in preparation.

と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.11 に示した。

#### 2.4.3. *Sporobolomyces shibatanus* (Okunuki) Verona et Ciferrii

Strains: K-2, K-20, K-21, K-32, K-38, K-57, K-63, K-64, K-107, K-116,  
K-215, K-228, K-237, K-245, K-283, K-290, K-382, K-384, K-390, K-394,  
K-399, K-401, K-414

上記 23 株は射出胞子の形態、および生理生化学性状から *S. shibatanus* と同定した。本菌株の生理生化学的性状を Table 4.11 に示した。

#### 2.4.4. *Sporobolomyces nylandii* Takashima et Nakase

Strains: K-77, K-81 (*Sporobolomyces* sp. 2); K-105 (*Sporobolomyces* sp. 3)

*Sporobolomyces* sp. 2 および *Sporobolomyces* sp. 3 は、Fig. 4.8 に示したように、*Sporobolomyces* sp. 1 および 6 と共に、*Sporid. ruineniae* var. *ruineniae*, *Sporid. ruineniae* var. *coprophilus*, および *Sporid. microsporus* とブーツストラップ値 95 % で系統枝を形成した。これらは各株の 18S rDNA 塩基配列の相同性は、いずれも 99 % 以上を示し、非常に近縁であると推定された。現在は *Sporidiobolus ruineniae* var. *ruineniae* のシノニムであるといわれている (Boekhout, 1991a)。*Sporidiobolus microsporus* (nom. nud.) も、この系統枝に位置した。そこで、これらと共に系統分類学的な研究を行った。

分離株および関連菌株の核 DNA を上記 1.3.3.c の方法によって調製した。G+C 含量を決定したところ、*Sporobolomyces* sp. 1, 2, 3 および 6 のいずれの供試株も 60-62 mol% で *Sporid. ruineniae* と類似した値を示した。

そこで、これらの供試株すべてについて、ITS 領域の塩基配列を決定し、ITS1 の塩基配列に基づいてグルーピングを行った (Fig. 4.9)。*Sporobolomyces* sp. 1 (K-41) は *Sporidiobolus ruineniae* の 2 つの変種と ITS1 の塩基配列が一致していた。また、*Sporobolomyces* sp. 2 (K-77 および K-81) と *Sporobolomyces* sp. 3 (K-105) も 3 株間の ITS1 の配列が一致していた。*Sporobolomyces* sp. 6 も供試株 6 株間の ITS1 の配列が一致していた。そこで、これら供試菌株間の、DNA 相同性を調べた。

Table 4.12 に示したように *Sporobolomyces* sp. 2 と 3 は互いに高い DNA 相同性を示した。*Sporobolomyces* sp. 6 はやや低い DNA 相同値を示すものもあるが、他の関連種とは異なった種であることが明らかとなった。*Sporobolomyces* sp. 1 は、*Sporidiobolus ruineniae* と高い相同値を示した。しかしながら、この実験結果からは、現在の *Sporid. ruineniae* の 2 つの変種のどちらに属するかは決定できなかった。また、*Sporidiobolus microsporus* は *Sporid. ruineniae* とは別の種であることが明らかとなった。

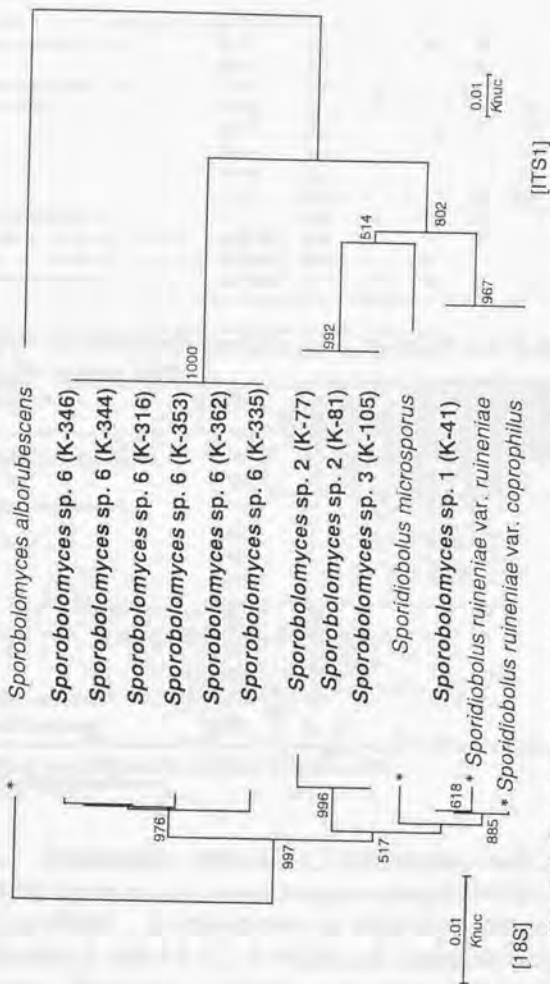


Fig. 4.9. Grouping of *Sporobolomyces* sp. 1, 2, 3 and 6, and related species based on ITS 1 sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 148 positions, using the neighbor-joining method (Saltou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the percentages from 1,000 replicate bootstrap sampling. Sites where gaps existed in any sequences were excluded for 18S rDNA and included for ITS1. \*, Hamamoto and Nakase, in preparation



Table 4.12. DNA relatedness among *Sporobolomyces* sp. 1, 2, 3 and 6, and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	mol% G+C	% relative binding of DNA from								
			K-77	K-105	K-335	K-316	K-41	JCM 1839	JCM 8097	JCM 8882	
<i>Sporobolomyces</i> sp. 2	K-77	60.2	100	89	24		21	17	14	17	
	K-81	60.4	117	112	29		26	21	20	23	
<i>Sporobolomyces</i> sp. 3	K-105	61.5	107	100			27	18	16	19	
<i>Sporobolomyces</i> sp. 6	K-335	62.7	41	37	100	92	29	20	18	16	
	K-316	61.9			83	100					
	K-344	62.1			101	98					
	K-346	62.4			62	54					
	K-362	62.1			92	100					
<i>Sporobolomyces</i> sp. 1	K-41	62.1	44	43	28		100	88	57	24	
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	JCM 1839	60.1	41	37	22		76	100	50	19	
<i>Sporid. ruineniae</i> var. <i>coprophilus</i>	JCM 8097	60.3	47	45	25		81	76	100	27	
<i>Sporid. microsporus</i>	JCM 6882	61.8	37	38	29		26	22	18	100	

Table 4.13. Differential characteristics among *Sporobolomyces* sp. 2/3 and 6, and *Sporidiobolus ruineniae*

Scientific name	Strain	Assimilation of				
		Galactose	Raffinose	Melezitose	Galactitol	L-Lysine
<i>Sporobolomyces</i> sp. 2/3	K-77	-	+	+	-	-
	K-105	-	W	W	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp. 6	K-316	+	-	-	+	-
	K-332	+	-	-	+	-
	K-335	L	-	-	+	LW
	K-344	L	-	-	+	LW
	K-346	+	-	-	+	-
	K-353	L	-	-	+	-
	K-354	+	-	-	+	LW
K-362	+	-	LW	+	LW	
<i>Sporid. ruineniae</i> *		+	+	-	+	
<i>Sporid. ruineniae</i>	K-41	L	+	-	+	+

+, positive; -, negative; w, weak; s, slow; L, latent; LW, latent and weak.

\*. Statzell-Tallman and Fall (1998).

本実験の結果、新種であることが確認された、K-77、K-81 および K-105 の3株を *Sporobolomyces nylandii* Takashima et Nakase と命名した。これらの菌株は JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10213 (K-77)、JCM 10214 (K-81) および JCM 10215 (K-105) である。*Sporobolomyces nylandii* は galactose、melezitose、galactitol、および L-lysine の資化性により、*Sporid. ruineniae* と区別可能である (Table 4.13)。本実験により新種であることが明らかとなった *Sporobolomyces* sp. 6 については、本項 2.4.5 に述べた。

*Sporobolomyces nylandii* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae ovoideae, ellipsoideae, elongatae aut cylindraceae, (3.0-8.0) x (4.0-15.0)  $\mu\text{m}$ , singulae, binae, aut catenulae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, pellicula fragilis et incompleta aut completa, et sedimentum formantur. In agarō 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura aurantiaca, glabra aut rugosa, nitida, mollis, marginē crosa. Pseudomycelium et mycelium formantur. Ballistospores reniformes aut ellipsoideae, (3.0-5.5) x (6.0-12.0)  $\mu\text{m}$ . Fermentatio nulla. Glucosum, L-sorboseum (lente), saccharosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, raffinoseum, melezitoseum, amyllum solubile (exiguum), D-arabosum (lente), D-ribosum (lente et exiguum), ethanolum, glycerolum, ribitolum (lente), D-mannitolum, D-glucitolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, glucono- $\delta$ -lactosum (lente et exiguum) et acidum succinicum (exiguum) assimilantur, at non galactosum, lactosum, melibiosum, inulinum, D-xylosum, L-arabosum, L-rhamnosum, erythritolum, galactitolum, salicinum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum DL-lacticum, acidum citricum, inositolum, acidum D-glucuronicum, nec acidum D-galacturonicum. Kalium nitricum, natrium nitrosum et ethylaminum assimilantur, at non L-lysinum nec cadaverinum. Maxima temperatura crescentiae: 33-35°C. Ad crescentiam vitaminum non necessarium est. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 60.2-61.5 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Oryza sativa*, JCM 10213 (originaliter ut K-77) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal, ellipsoidal, elongate or cylindrical, (3.0-8.0) x (4.0-15.0)  $\mu\text{m}$ , single, in pairs or in chains (Fig. 4.10). A sediment is formed. After one month at 17°C, an incomplete or complete fragile pellicle and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is deep orange to reddish orange, shining to semishining, smooth to delicate by wrinkled near the bottom, soft, and has an erose margin.

On slide culture, pseudomycelia and true mycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are kidney-shaped or ellipsoidal, (3.0-5.5) x (6.0-12.0)  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.10).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, L-sorbose (slow), sucrose, maltose, cellobiose, trehalose,

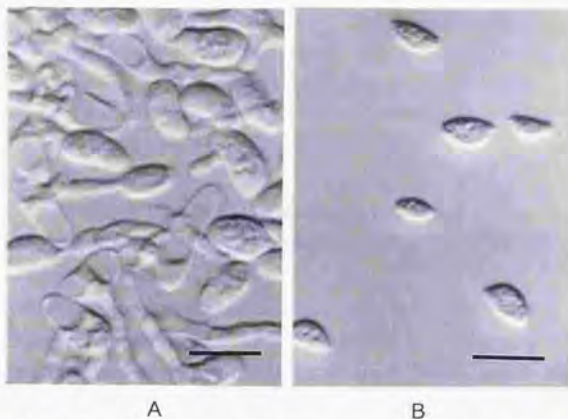


Fig. 4.10. *Sporobolomyces nylandii* (K-77 = JCM 10213T). A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 5 days at 17 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

raffinose, melezitose, soluble starch (weak), D-arabinose (latent), D-ribose (latent and weak), ethanol, glycerol, ribitol (latent), D-mannitol, D-glucitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, glucono- $\delta$ -lactone (latent and weak), and succinic acid (weak). Does not assimilate galactose, lactose, melibiose, inulin, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, erythritol, galactitol, salicin, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, DL-lactic acid, citric acid, inositol, D-glucuronic acid, or D-galacturonic acid.

Assimilates potassium nitrate, sodium nitrite and ethylamine hydrochloride. Does not assimilate L-lysine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 33-35°C.

No vitamins required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth weakly occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy or weakly liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 60.2-61.5 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: Three strains were examined. The strain K-77, which was isolated from a dead leaf of *Oryza sativa* collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1987, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama, as JCM 10213. The other strains K-81 and K-105 are also deposited in the Japan Collection of Microorganisms, as JCM 10214 and JCM 10215.

#### 2.4.5. *Sporobolomyces poonsookiae* Takashima et Nakase

Strains: K-316, K-332, K-335, K-344, K-346, K-353, K-354, K-362

(*Sporobolomyces* sp. 6)

上記 8 株の内、K-332 と K-354 を除く 6 株について、本項 2.4.4 で DNA-DNA 交雑実験を行い、新種であることが確認されたので、*Sporobolomyces poonsookiae* Takashima et Nakase と命名した。

K-332 は K-335 と、また K-354 は K-353 と同じサンプルから分離された株であり、生理生化学性状も一致していることからこれらと同種と考えられる。*Sporobolomyces poonsookiae* は、*S. nylandii* とは galactose, raffinose, melezitiose および galactitol の資化性によって区別される。また、*Sporid. ruinieniae* とは現在のところ raffinose の資化性によってのみ区別可能である (Table 4.13)。上記 8

株の内、DNA-DNA 交雑実験に用いた 6 株を JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10206 (K-316)、JCM 10207 (K-335)、JCM 10208 (K-344)、JCM 10209 (K-346)、JCM 10210 (K-353) および JCM 10211 (K-362) である。

*Sporobolomyces poonsookiae* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae ovoideae, ellipsoidales, elongatae aut cylindraceae, (3.0-5.0) x (4.0-14.0)  $\mu\text{m}$ , singulae, binae, catenulae, aut ramulosae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, pellicula fragilis et incompleta aut completa, et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura rubro-aurantiaca, glabra aut rugosa, nitida, mollis, margin erosa. Pseudomycelium et mycelium formantur. Ballistospores reniformes, (3.0-5.5) x (6.0-12.0)  $\mu\text{m}$ . Fermentatio nulla. Glucosum, galactosum (lente), L-sorbosum (lente), cellobiosum, trehalosum, amyllum solubile (exiguum), D-xylosum, L-arabiosum, D-arabiosum, D-ribosum, ethanolum, glycerolum, ribitolum, galactitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, salicinum, glucono- $\delta$ -lactonum, acidum succinicum (lente) et acidum citricum assimilantur, at non saccharosum, maltosum, lactosum, melibiosum, raffinose, melezitosum, inulinum, L-rhannosum, erythritolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum DL-lacticum, nec inositolum. Kalium nitricum, natrium nitrosus et ethylaminum assimilantur, at non L-lysinum (lente et exiguum) nec cadaverinum. Maxima temperatura cresecctiae: 33-36°C. Ad crescentiam vitaminum non necessarium est. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 61.9-62.7 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Mangifera indicalin*, JCM 10207 (originaliter ut K-335) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal, ellipsoidal, elongate or cylindrical, (3.0-5.0) x (4.0-14.0)  $\mu\text{m}$ , single, in pairs, in chains, or in branched chains (Fig. 4.11). A sediment is formed. After one month at 17°C, an incomplete or complete fragile pellicle and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is reddish orange, shining to semishining, smooth to delicate by wrinkled near the bottom; soft, and has an erose margin.

On slide culture, pseudomycelia and true mycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are kidney-shaped, (3.0-5.5) x (6.0-12.0)  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.11).

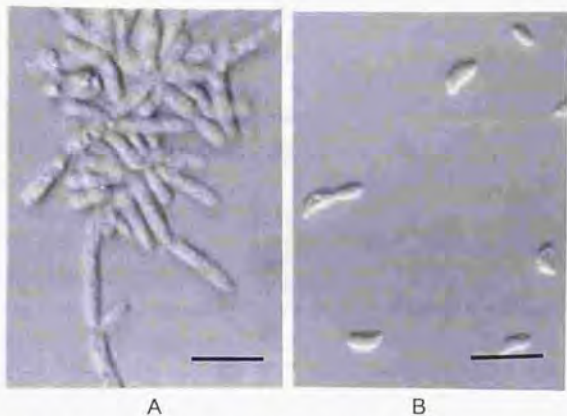


Fig. 4.11. *Sporobolomyces poonsookiae* (K-335 = JCM 10207<sup>T</sup>). A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 5 days at 25 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, galactose (latent), L-sorbose (latent), cellobiose, trehalose, soluble starch (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, ethanol, glycerol, ribitol, galactitol, D-mannitol, D-glucitol, salicin, glucono- $\delta$ -lactone, succinic acid (slow), and citric acid (weak). Does not assimilate sucrose, maltose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, L-rhamnose, erythritol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, DL-lactic acid, or inositol.

Assimilates potassium nitrate, sodium nitrite and ethylamine hydrochloride. Does not assimilate L-lysine hydrochloride (latent and weak), or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 33-36°C.

No vitamins required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 61.9-62.7 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: Six strains were examined. The strain K-335, which was isolated from a dead leaf of *Mangifera indica* collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1990, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama, as JCM 10207. The other strains K-316, K-344, K-346, K-353 and K-362 are also deposited in the Japan Collection of Microorganisms, as JCM 10206, JCM 10208, JCM 10209, JCM 10210 and JCM 10211.

#### 2.4.6. *Sporobolomyces vermiculatus* Takashima et Nakase

Strains: K-17, K-19, K-90, K-91, K-92, K-93, K-109, K-383

(*Sporobolomyces* sp. 4)

供試株のDNAを第二章第二節1.3.3.1.cの方法によって調製し、G+C含量を決定したところ、すべて51-52 mol%であった。供試株の18S rDNA塩基配列に基づく系統関係を見ると (Fig. 4.8), *Sporobolomyces* sp. 4の位置するクラスターに属する*Sporobolomyces*属のなかでは、*S. elongatus*以外は主要ユビキノンがQ-10であった。また、G+C含量を見ると、*S. oryzae* および *S. coprosmae* (58.8

mol%および58.0 mol%, Hamamoto and Nakase, 1995)の2種とは7 mol%の差があった。*S. kluyveri* とは G+C 含量も4 mol%以上異なり、また、硝酸塩および亜硝酸塩の資化性が異なることから、これらを除いた、同クラスターの種 (*S. foliicola*, *S. salicinus*, *S. gracilis* および *S. phyllomatis*) と DNA-DNA 交雑実験を行った。その結果、*Sporobolomyces* sp. 4 は他の種とは低い相同性を示し (Table 4.14)、異なった種であることが明らかとなった。そこで、これらを *Sporobolomyces vermiculatus* Takashima et Nakase と命名した。

Table 4.14. DNA relatedness among *Sporobolomyces* sp. 4 and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	mol% G+C	% relative binding of DNA from		
			K-17	K-383	JCM 5355
<i>Sporobolomyces</i> sp. 4	K-17	51.7	100	65	13
	K-90	52.0	65	72	12
	K-109	52.1	63	78	13
	K-383	51.5	72	100	14
<i>S. foliicola</i>	JCM 5355	56.1	10	7	100
<i>S. salicinus</i>	JCM 2959	50.1	8	7	
<i>S. gracilis</i>	JCM 2963	49.8	9	8	
<i>S. phyllomatis</i>	JCM 7549	47.0	8	6	

DNA-DNA 交雑実験に用いなかった K-91、K-92 および K-93 は K-90 と同じサンプルから分離され、生理生化学性状も一致しており、同種であると考えられる。*Sporobolomyces vermiculatus* は、生理生化学的に類縁の種とは多くの点で異なっていたが、他のすべてと異なっているという性質は見いだせなかった。しかしながら、Table 4.15 に示したような性質の組み合わせにより、区別は可能であった。上記 8 株の内、DNA-DNA 交雑実験に用いた 4 株を JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10221 (K-17)、JCM 10222 (K-90)、JCM 10223 (K-109) および JCM 10224 (K-383) である。

*Sporobolomyces vermiculatus* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae ovoideae aut ellipsoidales, (2.0-5.0) x (3.0-9.0) μm, singulae aut binae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, annulus, insulae, et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura rubro-aurantiaca, glabra aut rugosa, nitida, mollis, margin glabra. Pseudomycelium non formatur. Ballistosporae ellipsoidales aut longi-ellipsoidales, et rectae, (2.0-4.5) x (6.0-12.0) μm. Fermentatio nulla. Glucosum, galactosum, L-sorbosum (lente et exiguum), saccharosum (lente), cellobiosum,



trehalosum, melezitiosum, amyllum solubile, D-xylosum, L-arabiosum, D-arabiosum (lente), D-ribosum (exiguum), glycerolum, ribitolum (lente et exiguum), D-mannitolum (lente), D-glucitolum (lente), glucono- $\delta$ -lactonum (lente et exiguum) et acidum succinicum (lente et exiguum) assimilantur, at non maltosum, lactosum, melibiosum, raffiniosum, inulinum, L-rhamnosum, ethanolum, erythritolum, galactitolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum DL-lacticum, acidum citricum, inositolum, acidum D-glucuronicum, nec acidum D-galacturonicum. L-lysinum assimilantur, at non kalium nitricum, natrium nitrosium, ethylaminum nec cadaverinum. Maxima temperatura crescentiae: 29-34°C. Ad crescentiam acidum *p*-aminobenzonicum et thiaminum necessarium sunt. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 51.5-52.1 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Imperata cylindracea*, JCM 10221 (originaliter ut K-17) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal or ellipsoidal, (2.0-5.0) x (3.0-9.0)  $\mu$ m, single or in pairs (Fig. 4.12). A sediment is formed. After one month at 17°C, a complete ring, islets, and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is reddish orange to orange red, shining to semishining, smooth to delicate by wrinkled near the bottom, soft, and has an entire margin.

On slide culture, pseudomycelia is produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are ellipsoidal or long-ellipsoidal, and usually straight, (2.0-4.5) x (6.0-12.0)  $\mu$ m (Fig. 4.12).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, galactose, L-sorbose (latent and weak), sucrose (latent), cellobiose (latent), trehalose, melezitose, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabiose (latent), D-ribose (weak), glycerol, ribitol (latent and weak), D-mannitol (latent), D-glucitol (latent), glucono- $\delta$ -lactone (latent and weak), and succinic acid (latent and weak). Does not assimilate maltose, lactose, melibiose, raffinose, inulin, L-rhamnose, ethanol, erythritol, galactitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, salicin, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, DL-lactic acid, citric acid, inositol, D-glucuronic acid, or D-galacturonic acid.

Assimilates L-lysine hydrochloride. Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

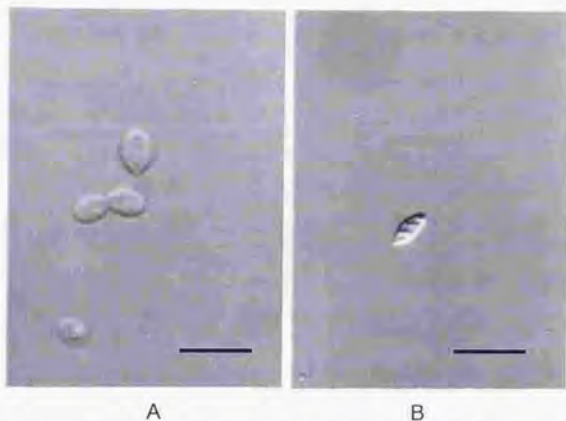


Fig. 4.12. *Sporobolomyces vermiculatus* (K-17 = JCM 10221<sup>T</sup>).  
A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 28 days at room temperature. Scales = 10  $\mu$ m.

Table 4.15. Differential characteristics among *Sporobolomyces* sp. 4 and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	Assimilation of												
		Galactose	L-Sorbose	Sucrose	Cellobiose	Raffinose	Melibiose	Inulin	Soluble starch	L-Arabinose	D-Fructose	L-Rhamnose	Ethanol	
<i>Sporobolomyces</i> sp. 4	K-17	+	L/+	+	W/+	W/-	+	W/-	W/-	W/+	W/-	+	+	
	K-90	+	LW	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	
	K-109	+	W	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	
	K-383	+	LW	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Sporobolomyces foliicola</i> *		W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Sporobolomyces salicinus</i> *		+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	
<i>Sporobolomyces gracilis</i> *		+	Y	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Sporobolomyces phylloinatis</i> *		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Scientific name	Strain	Assimilation of												
		Galactose	D-Glucitol	Salicin	Glucono-5-lactone	2-Keto-gluconic acid	5-Keto-gluconic acid	DL-Lactic acid	Citric acid	D-Gluconic acid	D-Gluconic acid	Phosphatase nitrate	Sodium nitrite	L-Lysine
<i>Sporobolomyces</i> sp. 4	K-17	W/+	W/+	W/-	V	L/-	-	-	W	+	+	+	+	L
	K-90	+	+	W	+	+	+	+	W	+	+	+	+	DW
	K-109	+	L	-	LW	-	-	-	W	+	+	+	+	DW
<i>Sporobolomyces foliicola</i> *	K-383	+	L	-	LW	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sporobolomyces salicinus</i> *	+	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sporobolomyces gracilis</i> *	+	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sporobolomyces phylloinatis</i> *	+	L	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	W

+, positive; -, negative; w, weak; s, slow; L, latent; LW, latent and weak; V, variable.  
 \*, Boekhout and Nakase (1998c).

Maximum growth temperature is 29-34°C.

*p*-Aminobenzoic acid and thiamin are required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 51.5-52.1 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: Four strains were examined. The strain K-17, which was isolated from a dead leaf of *Imperata cylindrica* collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1987, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama, as JCM 10221. The other strains K-90, K-109 and K-383 are also deposited in the Japan Collection of Microorganisms, as JCM 10222, JCM 10223 and JCM 10224.

#### 2.4.7. *Sporobolomyces blumeae* Takashima et Nakase

Strain: K-230

K-230 (*Sporobolomyces* sp. 5)は 18S rDNA 塩基配列に基づく系統樹では (Fig. 4.8), *S. roseus* および *Sporid. pararoseus* などと類縁を示した。これら 2 株と K-230 の 18S rDNA 塩基配列の相同性は、それぞれ 99.1 %であった。しかしながら、供試株の DNA を上記 1.3.3.c の方法によって調製し、G+C 含量を決定したところ、59.5 mol%であり、*S. roseus* および *Sporid. pararoseus* より 10 mol% 以上高かった。

Fig. 4.5 で *Sporid. johnsonii* および *Sporid. salmonicolor* は、*S. roseus* および *Sporid. pararoseus* よりは、やや K-230 から離れた位置に位置していた。この 2 株はシノニムであると報告されている (Boekhout, 1991a)。また、*S. holsaticus* は *Sporid. johnsonii* の不完全時代であるとされている (Statzell-Tallman and Fell, 1998)。従って、これら 5 種は系統的に極めて近縁な種と考えられる。そこで、*Sporid. pararoseus* の不完全時代である *Sporobolomyces shibatanus* を除き、これら 5 種の基準種と K-230 の ITS 領域の塩基配列を比較をおこなった。K-230 は他のいずれの種とも異なった配列を示しており、18S rDNA 塩基配列に基づく系統樹では近縁な *S. roseus* および *Sporid. pararoseus* ともそれぞれ 17 塩基異なっていた (Fig. 4.13)。また、*Sporid. johnsonii* と *S. holsaticus* の ITS1 は、一致していた。DNA-DNA 交雑実験の結果、*Sporobolomyces* sp. 5 は他とは低い DNA 相同値で、別の

## [ITS1]

S.sp.5.K230 GTGAAT-AACAGGGTGTCCAATTTAACTTGGAGCCCGATC-TTC-CACTTTCTAACTTG  
 S.para.5350 T...AAC-.....A..A.A-...T..A-.....  
 S.rose.5353 .....A..T.....A.....C-...T..A-...CC..  
 S.john.1840 .....T..T.....C-...T.....CC..  
 S.hols.5296 .....T..T.....C-...T.....CC..  
 S.salm.1841 .....A.....A.A.C..T.....CC..

S.sp.5.K230 TGCATCTGTATAT--TGGCGA-GCGGTCTTCGGACTGTGAGCC--TTCACCTACAAA-CA  
 S.para.5350 .....AA.....AA-.....T.....  
 S.rose.5353 .....AA.....AA.T.....T.....AT.....TAT..A..  
 S.john.1840 .....C.AA...T..A..T.CT...C-...C-...-A-...  
 S.hols.5296 .....C.AA...T..A..T.CT...C-...C-...-A-...  
 S.salm.1841 .....C.AAC..T...T.C...GTG.C.....TA.....

S.sp.5.K230 -CTAGTCTATGAATGTAACTTTTTATAAC-ATATAA  
 S.para.5350 .....A.....A-.....  
 S.rose.5353 .....A.....A-.....  
 S.john.1840 C.G.....A.....T-..AA.C.....T.....  
 S.hols.5296 C.G.....A.....T-..AA.C.....T.....  
 S.salm.1841 C.A.....T-..AA.C.....T.....

## [ITS2]

S.sp.5.K230 GAATCTTCAACCCAACACTGTTTATAAAAGCGGTT-GGTSTTTGGATTCTGAGCGCTGCT  
 S.para.5350 .....TCT...C..GT..T..A-.....T.....  
 S.rose.5353 .....C..GT..A.A.C-.....  
 S.john.1840 .....C.TC...C..GT..A..T..G...C.....T.....  
 S.hols.5296 .....C..C..C..GT...CG.G...C.....T.....  
 S.salm.1841 .....C..C..C..GC..A..CG.G...C.....

S.sp.5.K230 GGCTTC-GGCCTAGCTCGTTCGTAATGCATCAGCATCCCTAATACAAGTTGGATTGACT  
 S.para.5350 ...G.T-T.....A...T.....  
 S.rose.5353 .....GT.....A.....  
 S.john.1840 .A-..A-T-...T.....G.TG.....  
 S.hols.5296 .A-..A-T-...T.....G.TG.....  
 S.salm.1841 .....T.....G.TG.....

S.sp.5.K230 TGGCGTAATAGACTATTCGCTAAGGATTTCAGT---TCTCGG--ACTGAGCCAGCTTAAT  
 S.para.5350 .....G..GG---AAAC--TC.....A...C..  
 S.rose.5353 .....A.G---T...C-...A.....  
 S.john.1840 .....G...G.A...GGGTC-.CC-...A..CGT.  
 S.hols.5296 .....G.A...GGGTC-.CC-...A..CGT.  
 S.salm.1841 .....G...G.A...GGCC.TCG..TT.....A..CGT.

S.sp.5.K230 TAAGGAAGCTTCTAGTC-ACAAAGTCTACCTTT-AGA  
 S.para.5350 .....C...A.TT-...T-...  
 S.rose.5353 ..T.....A.TG-...-...  
 S.john.1840 .C.....A..CC.....T...  
 S.hols.5296 .C.....A..CC.....T...  
 S.salm.1841 .C.....AC.CCT.....T...

Fig. 4.13. Alignment of ITS1 and ITS2 sequences of *Sporobolomyces* sp. 5 and phylogenetically closely related species.

Abbreviation. S.sp.5.K230, *Sporobolomyces* sp. 5 (K-230); S.para.5350, *Sporid. pararoseus* JCM 5350;  
 S.rose.5353, *S. roseus* JCM 5353; S.john.1840, *Sporid. johnsonii* JCM 1840; S.hols.5296, *S. holsaticus* JCM 5296;  
 S.salm.1841, *Sporid. salmonicolor* JCM 1841.

種であることが明らかになった。また、*Sporid. johnsonii* と *S. holsaticus* は高い相関値を示したが、*Sporid. salmonicolor* と *Sporid. johnsonii* は異なった種であることが示された (Table 4.16)。

Table 4.16. DNA relatedness among *Sporobolomyces* sp. 5 and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	mol% G+C	% relative binding of DNA from					
			K-230	JCM 5350	JCM 5353	JCM 1841	JCM 1840	JCM 5296
<i>Sporobolomyces</i> sp. 5	K-230	59.5	100	19	25	14	12	12
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JCM 5350	46.9	12	100	29			
<i>Sporobolomyces roseus</i>	JCM 5353	48.5	8	9	100			
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	JCM 1841	53.7	16			100	19	14
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	JCM 1840	54.6	14			28	100	51
<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	JCM 5296	53.1	3			27	84	100

Table 4.17. Differential characteristics among *Sporobolomyces* sp. 5 and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	Assimilation of				
		Raffinose	Ribitol	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	Citric acid	Potassium nitrate
<i>Sporobolomyces</i> sp. 5	K-230	+	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i> <sup>1)</sup>		+	V	V	V	+
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> <sup>2)</sup>		+	V	+	V	-
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> <sup>2)</sup>		-	s	+	V	+
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> <sup>2)</sup>		V	+	V	-	+

+, positive; -, negative; s, slow; V, variable.

<sup>1)</sup> Boekhout and Nakase (1998); <sup>2)</sup> Statzell-Talman and Fall (1998).

新種であることが明らかとなった *Sporobolomyces* sp. 5 を *Sporobolomyces blumeae* Takashima et Nakase と命名した。*Sporobolomyces blumeae* は系統的に近縁な *S. roseus* および *Sporid. pararoseus* と生理生化学性状も類似していたが、*S. roseus* とは硝酸塩の資化性で、また *Sporid. pararoseus* とは  $\alpha$ -methyl-D-glucoside の資化性によって区別可能である (Table 4.17)。供試株 K-230 は JCM に寄託し、その保存番号は JCM 10212 である。

*Sporobolomyces blumeae* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae ovoideae aut ellipsoidales, (3.0-8.0) x (4.0-15.0)  $\mu$ m, singulae, binae, aut messae. Sedimentum formatur. Post unum

mensem ad 17°C, annulus incompletus, insulae, et sedimentum formantur. In agar  
'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura glauco-aurantiaca aut rubro-aurantiaca, glabra  
aut rugosa, hebetata, mollis, margin glabra. Pseudomycelium formantur.  
Ballistosporeae reniformes, ellipsoidales, aut longi-ellipsoidales, (3.0-5.5) x (6.0-12.0)  
µm. Fermentatio nulla. Glucosum, L-sorboseum (lente), saccharosum, maltosum,  
cellobiosum (lente), trehalosum, raffinoseum, melezitoseum, amyllum solubile, D-  
mannitolium (lente), D-glucitolium (lente), salicinum, glucono-δ-lactonum (exiguum) et  
acidum succinicum (lente et exiguum) assimilantur, at non galactosum, lactosum,  
melibiosum, inulinum, D-xylosum, L-arabiosum, D-arabiosum, D-ribosum, L-  
rhamnosum, ethanolum, glycerolum, erythritolum, ribitolium, galactitolium, α-methyl-D-  
glucosidum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum DL-lacticum,  
acidum citricum, nec inositolium. L-Lysinum et cadaverinum assimilantur, at non  
kalium nitricum, natrium nitrosus, nec ethylaminum. Maxima temperatura crescentiae:  
32-33°C. Ad crescentiam vitaminum non necessarium est. Diazonium caeruleum B  
positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 59.5 mol%  
(per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens.  
Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Blumea* sp. JCM 10212 (originaliter ut K-230)  
conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms',  
Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are ovoidal or ellipsoidal,  
(3.0-8.0) x (4.0-15.0) µm, single, in pairs, or in groups (Fig. 4.14). A sediment is  
formed. After one month at 17°C, a dotted ring, islets, and a sediment are present.

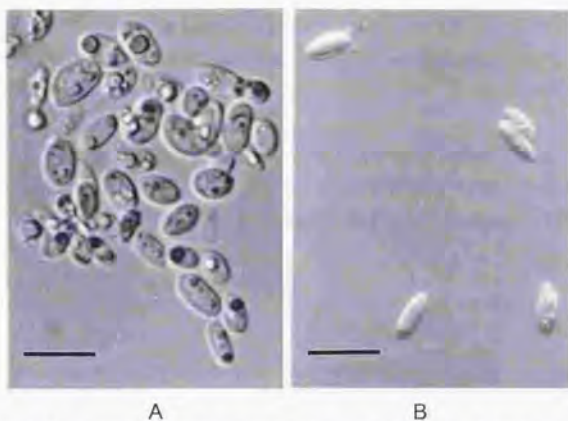
On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is greyish orange to  
reddish orange, semishiny to dull, smooth to delicate by wrinkled near the bottom, soft,  
and has an entire margin.

On slide culture, pseudomycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are kidney-  
shaped, ellipsoidal or long-ellipsoidal, (3.0-5.5) x (6.0-12.0) µm (Fig. 4.14).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, L-sorbose (latent), sucrose, maltose, cellobiose (latent),  
trehalose, raffinose, melezitose, soluble starch, D-mannitol (latent), D-glucitol (latent),  
salicin, glucono-δ-lactone (weak), and succinic acid (latent and weak). Does not  
assimilate galactose, lactose, melibiose, inulin, D-xylose, L-arabiose, D-arabiose, D-  
ribose, L-rhamnose, ethanol, glycerol, erythritol, ribitol, galactitol, α-methyl-D-  
glucoside, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, DL-lactic acid, citric acid, or  
inositol.



A

B

Fig. 4.14. *Sporobolomyces blumeae* (K-230 = JCM 10212T). A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 4 days at room temperature. Scales = 10  $\mu$ m.



Assimilates L-lysine hydrochloride and cadaverine dihydrochloride (weak).  
Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, or ethylamine hydrochloride.

Maximum growth temperature is 32-33°C.

No vitamins required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

Urease positive.

Does not liquefy liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 59.5 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: The strain K-230, which was isolated from a dead leaf of *Blumea* sp. collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec, 1990, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wakō, Saitama, as JCM 10212.

## 2.5. *Tilletiopsis* 属

タイの植物試料から射出胞子形成酵母を分離する際、ほとんどの試料から、*Tilletiopsis* 属様のコロニー形態をもつ株が得られた。しかし、当初の分離目的を射出胞子形成酵母に限定したため、これら *Tilletiopsis* 属様のコロニーは、釣菌しなかった。本実験に用いた *Tilletiopsis* sp. 1, 2, 3 および 4 は、培地上では一般的に酵母と認められるようなコロニーを形成し、いわゆる酵母として分離された。射出胞子の形態が非対称形であり、菌体にキシロースを含まず、主要コピキノン系が Q-10 であったため、当初は *Sporobolomyces* 属に属すると推定されていた株である。18S rDNA 塩基配列の系統学的解析の結果、これら供試株はクロボキン綱に位置することが明らかとなったため、*Tilletiopsis* sp. 1 (K-95)、*Tilletiopsis* sp. 2 (K-125)、*Tilletiopsis* sp. 3 (K-132) および *Tilletiopsis* sp. 4 (K-139) として研究を行った。

### 2.5.1. *Tilletiopsis flava* (Tubaki) Boekhout

Strain: K-95 (*Tilletiopsis* sp. 1)

*Tilletiopsis* 属の供試株は、Fig. 4.8 に示したように、18S rDNA に基づく系統樹では、2 グループに分かれた。*Tilletiopsis* sp. 1, 2 および 3 は *T. flava* および *T. fulvescens* と近縁であると推定された。

*Tilletiopsis* sp. 1 (K-95), 2 (K-125) および 3 (K-132) の DNA を上記 1.3.3.c の方法によって調製し、G+C 含量を決定したところ、それぞれ、60、61.2 および 61.5 mol% であった。一方、系統的に近縁であった *T. flava* JCM 5186 は 60.3 mol%、*T. fulvescens* JCM 5187 は 63.5 mol% で比較的類似した値を示した。そこで、*Tilletiopsis* sp. 1, 2, 3, *T. flava* および *T. fulvescens* の 5 株間の DNA 相同性を調べた (Table 4.18)。

*Tilletiopsis* sp. 1 (K-95) は *T. flava* と高い相同性を示したので、*T. flava* と同定した。第二章第三節に *Tilletiopsis flava* の基準株である JCM 5186 は 18S rDNA に 3 つの group I intron を含んでいたと述べた。*Tilletiopsis flava* と同定した K-95 も同じ位置にそれぞれ group I intron の挿入があり、またイントロン部分の塩基配列もほぼ一致していた。K-95 は現在までに報告されている中で、*T. flava* と同定された 2 番目の菌株である。本菌株は JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10219 である。本菌株の生理生化学性状については、Table 4.19 に示した。

Table 4.18. DNA relatedness among *Tilletiopsis* sp. 1, 2, 3 and 4, and phylogenetically closely related species

Scientific name	Strain	mol% G+C	% relative binding of DNA from						
			K-125	K-132	K-95	JCM 5186	JCM 5187	K-139	JCM 8361
<i>Tilletiopsis</i> sp. 2	K-125	61.2	100	63	33	39	30		
<i>Tilletiopsis</i> sp. 3	K-132	61.5	58	100	31	36	30		
<i>Tilletiopsis</i> sp. 1	K-95	60.0	40	44	100	99	25		
<i>Tilletiopsis flava</i>	JCM 5186	60.3	33	37	72	100	17		
<i>Tilletiopsis fulvescens</i>	JCM 5187	63.5	12	12	10	11	100		
<i>Tilletiopsis</i> sp. 4	K-139	56.7						100	7
<i>Tilletiopsis minor</i>	JCM 8361	54.1						9	100

### 2.5.2. *Tilletiopsis dextrii* Takashima et Nakase

Strains: K-125 (*Tilletiopsis* sp. 2); K-132 (*Tilletiopsis* sp. 3)

上記 DNA-DNA 交雑実験の結果、*Tilletiopsis* sp. 2 (K-125) と *Tilletiopsis* sp. 3 (K-132) の DNA 相同性は、58-63 % といわゆる中間値を示した。この 2 株は、共に、他の関連菌株とは低い相同性で、別の種であることが確認された (Table 4.18)。

これら 2 株の 18S rDNA 塩基配列を比べてみると、エクソン部分は 99.9 % の相同性があったにも関わらず、*Tilletiopsis* sp. 3 (K-132) は 2 つの group I intron を含んでおり、*Tilletiopsis* sp. 2 (K-125) は含んでいなかった。生理生化学

Table 4.19. Salient characteristics of *Tilletiopsis* spp. isolated from Thailand

Species	Strain No.	Assimilation of carbon compounds																					
		Galactose	L-Sorbose	Maltose	Cellobiose	Lactose	Melibiose	Raffinose	Methyrose	Inulin	L-Arabinose	D-Arabinose	D-Ribose	L-Fructose	D-Glucosamine	N-Acetyl-D-glucosamine	Methanol	Ethanol	Glycerol	Erythritol	Ribitol	D-Galucitol	
<i>T. denii</i>	JCM 10217 (K-125)	+	LW-/+	+	+	+	+	+	+	+	+/L	+	+/LW	-/+	+	+	+	+	+	+	LW	LW	+
<i>T. denii</i>	JCM 10218 (K-132)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/LW	LW	+/LW	LW	+	+	+	+	+	+	+	+/L	+/L
<i>T. flava</i>	JCM 10219 (K-95)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	LW/L	W/+	W/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. subvevans</i> *		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. pennisiif</i>	JCM 10219 (K-139)	+	+	+	L	+	+	+	+	+	+	LW	+	+	+	+	+	+	+	+	LW	LW	-LW
<i>T. minor</i> *		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Species	Strain No.	Assimilation of carbon compounds												Assimilation of nitrogen compounds					Vitamins required									
		$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	Salmon	Glucono- $\delta$ -lactone	D-Gluconate	2-Ketogluconic acid	6-Ketogluconic acid	D-Lactate	Succinate	Citrate	Hexadecane	D-Guconic acid	D-Galacturonic acid	Potassium nitrate	Sodium nitrite	Ethylamine-hydrochloride	L-Lysine-hydrochloride	Cadaverine-dihydrochloride										
<i>T. denii</i>	JCM 10217 (K-125)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Thiamine		
<i>T. denii</i>	JCM 10218 (K-132)	+	+	+/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Thiamine	
<i>T. flava</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n		
<i>T. flava</i>	JCM 10219 (K-95)	+	+	+/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Thiamine	
<i>T. subvevans</i> *		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n		
<i>T. pennisiif</i>	JCM 10216 (K-139)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Thiamine	
<i>T. minor</i> *		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	

+ positive, - negative, w, weak, s, slow, L, latent, LW, latent and weak, V, variable, n, no data.

\* Bielecki (1959).

的には、これらは Table 4.19 に示したように、cellobiose と L-arabinose の 2 つの炭素源の資化性が異なっている。しかしながら、他に明確な差がなく、また、*Tilletiopsis* sp. 2 と *Tilletiopsis* sp. 3 は、共に 1 株ずつしか分離されていないことから、種内の性状の差について考察することができない。以上のことから、*Tilletiopsis* sp. 2 および 3 を 1 新種とするのが妥当であると判断し、*Tilletiopsis dextrii* Takashima et Nakase と命名した。供試株は JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10217 (K-125) および JCM 10218 (K-132) である。

*Tilletiopsis dextrii* は Table 4.19 に示すように、生理生化学性状により、*T. fulvescens* とは明らかに区別されるが、*T. flava* とは識別できない。18S rDNA の塩基配列の類似度はそれぞれ 99.6% 以上で、非常に近縁な種であると思われる。

現在までに、同一種の中で、group I intron を含む株とそうではない株が混在する例は報告されていない。むしろ、18S rDNA の保存性の高さから考えて、同一種内ではイントロンも 18S rDNA の中に同様に保持されているであろうと考えられている。イントロンの存在が種に特異的な形質となりうるかどうかは、イントロンの欠失がどのような機構でおこるかが明らかになったときに解決されることであろう。Group I intron は進化のある過程で特定の位置に水平移動によって挿入され、その後、その位置で他の遺伝子と共に伝わっていったという説に従えば、*T. dextrii* の 2 株の場合、種の分化が起こった後、一方 (JCM 10218) のイントロンはそのまま保存され、他方 (JCM 10217) のイントロンは失われたということになる。また、上述したように *T. dextrii* は *T. flava* と非常に近縁であると推定されるが、*T. flava* に報告されている 2 株は同一位置に group I intron の挿入がある。さらに、*T. dextrii* と *T. flava* の group I intron の挿入位置は 1199 と 1506 は共通の位置であるが、*T. dextrii* では挿入位置 516 には含まれていない。これらは、今後、group I intron の挿入および欠失を議論する上で、重要な材料となることと思われる。

*Tilletiopsis dextrii* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae elongatae aut cylindraceae, (1.4-4.4) x (4.0-30.0)  $\mu\text{m}$ , singulae, binae, catenulae, aut ramulosae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, pellicula fragilis et incompleta aut completa, et sedimentum formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura glauciflava aut luteola, rugosa aut reticulata, hebetata, mollis, margin erosa aut undulata. Pseudomycelium et mycelium formantur. Ballistospores allantoideae aut falcatae, (1.5-2.5) x (7.0-16.0)  $\mu\text{m}$ . Fermentatio nulla. Glucosum, L-sorbosum (lente et exiguum), saccharosum, maltosum, trehalosum, raffinose, inulinum, amyllum solubile, D-xylosum, D-arabinosum, D-ribosum, glycerolum, erythritolum, ribitololum (lente), D-mannitololum, D-glucitololum, glucono- $\delta$ -lactonum, acidum succinicum (exiguum), et

acidum D-glucuronicum (lente et exiguum) assimilantur, at non galactosum, cellobiosum, lactosum, melibiosum, melezitiosum, L-arabiosum, L-rhamnosum, ethanolum, galactitolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum DL-lacticum, acidum citricum, inositolum, nec acidum D-galacturonicum. Kalium nitricum (lente et exiguum) assimilantur, at non natrium nitrosum, ethylaminum, L-lysinum nec cadaverinum. Maxima temperatura crescentiae: 33-36°C. Ad crescentiam thiaminum necessarium sunt. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 61.2-61.5 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Oryza sativa*, JCM 10217 (originaliter ut K-125) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are elongate or cylindrical, (1.4-4.4) x (4.0-30.0)  $\mu$ m, single, in pairs, in chains, or in branched chains (Fig. 4.15). A sediment is formed. After one month at 17°C, an incomplete or complete fragile pellicle and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is greyish yellow to pale yellow, dull shining to dull, wrinkled or netted, soft, and has an erose or undulate margin.

On slide culture, pseudomycelia and true mycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are allantoid or sickled-shaped, (1.5-2.5) x (7.0-16.0)  $\mu$ m (Fig. 4.15).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, L-sorbose (latent and weak), sucrose, maltose, trehalose, raffinose, inulin, soluble starch, D-xylose, D-arabinose, D-ribose, glycerol, erythritol, ribitol (latent), D-mannitol, D-glucitol, glucono- $\delta$ -lactone, succinic acid (weak), and D-glucuronic acid (latent and weak). Does not assimilate galactose, cellobiose, lactose, melibiose, melezitose, L-arabiose, L-rhamnose, ethanol, galactitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, salicin, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, DL-lactic acid, citric acid, inositol, or D-galacturonic acid.

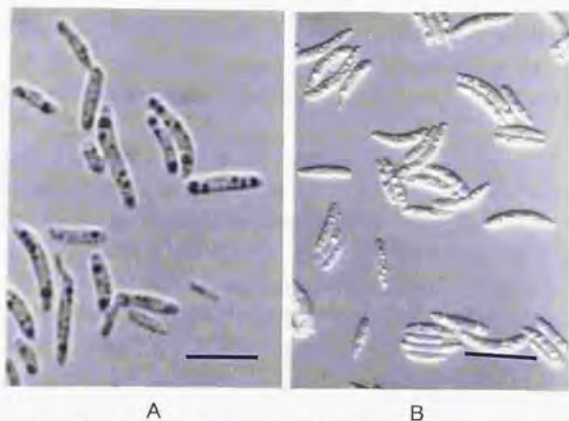
Assimilates potassium nitrate (latent and weak). Does not assimilate sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, L-lysine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 33-36°C.

Thiamin required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.



A B  
Fig. 4.15. *Tilletiopsis derxii* (K-125 = JCM 102171). A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 6 days at 17 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

Urease positive.

Liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.

The G+C content of nuclear DNA is 61.2-61.5 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: Two strains were examined. The strain K-125, which was isolated from a dead leaf of *Oryza sativa* collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1987, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama, as JCM 10217. The other strain K-132 is also deposited in the Japan Collection of Microorganisms, as JCM 10218.

### 2.5.3. *Tilletiopsis penniseti* Takashima et Nakase

Strain: K-139 (*Tilletiopsis* sp. 4)

*Tilletiopsis* sp. 4 (K-139)のDNAを第二章第二節 1.3.3.cの方法によって調製し、G+C含量を決定したところ、56.7 mol%であった。一方、系統的に近縁であった *T. minor* JCM 8361 は 54.1 mol% で比較的類似した値を示した (Fig. 4.8)。そこで、これら 2 株間の DNA 相同性を調べたところ、Table 4.18 に示したように低い相同値で、別種であることが明らかとなった。そこで、本菌株を *Tilletiopsis penniseti* Takashima et Nakase と命名した。*Tilletiopsis penniseti* は Table 4.19 に示したように、*T. minor* と明確に区別される。本菌株は JCM に寄託し、その登録番号は JCM 10216 である。

### *Tilletiopsis penniseti* Takashima et Nakase, sp. nov.

In liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C, cellulae elongatae aut cylindraceae, (1.4-3.0) x (10.0-50.0)  $\mu$ m, singulae, binae, catenulae, aut ramulosae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 17°C, pellicula dura et completa, et sedimentum formantur. In agaro 'YM', post unum mensem ad 17°C, cultura luteola, rugosa aut reticulata, hebetata, mollis, margin erosa. Pseudomycelium et mycelium formantur. Ballistospores elongatae aut falcatae, (1.0-2.0) x (7.0-17.0)  $\mu$ m. Fermentatio nulla. Glucosum, saccharosum, maltosum, cellobiosum (lente), trehalosum, raffinose (exiguum), melezitosum, amylopectinum, D-xylosum, L-arabinosum, D-arabinosum (lente), D-ribosum (lente), L-rhamnosum, glycerolum (lente et exiguum), erythritolum (lente), D-mannitololum, salicinum, acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum succinicum (exiguum), et acidum D-glucuronicum (exiguum) assimilantur, at non galactosum, L-sorbose, lactosum, melibiosum, inulinum, ethanololum, ribitololum,

galactitolum, D-glucitolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, glucono- $\delta$ -lactonum, acidum DL-lacticum, acidum citricum, inositolum, nec acidum D-galacturonicum. Kalium nitricum assimilantur, at non natrium nitrosus, ethylaminum, L-lysinum nec cadaverinum. Maxima temperatura crescentiae: 32-33°C. Ad crescentiam thiaminum necessarium sunt. Diazonium caeruleum B positivum. Proportio molaris guanini+cytosini in acido deoxyribonucleico: 56.7 mol% (per HPLC). Ubiquinonum majus: Q-10. Xylosum in cellulis absens. Holotypus: Isolatus ex folio emortuo *Pennisetum pedicellatum*, JCM 10216 (originaliter ut K-139) conservatur in collectionibus culturarum quas 'Japan Collection of Microorganisms', Wako, Saitama sustentat.

In YM broth, after 3 days at 25°C, the vegetative cells are elongate or cylindrical, (1.4-3.0) x (10.0-50.0)  $\mu$ m, single, in pairs, in chains, or in branched chains (Fig. 4.16). A sediment is formed. After one month at 17°C, a complete tough pellicle and a sediment are present.

On YM agar, after one month at 17°C, the streak culture is pale yellow, dull shining to dull, wrinkled or netted, soft, and has an erose margin.

On slide culture, pseudomycelia and true mycelia are produced.

Ballistoconidia are abundantly produced on corn meal agar. They are ellongate or sickled-shaped, (1.0-2.0) x (7.0-17.0)  $\mu$ m (Fig. 4.16).

Does not ferment glucose.

Assimilates glucose, sucrose, maltose, cellobiose (latent), trehalose, raffinose (weak), melezitose, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (latent), D-ribose (latent), L-rhamnose, glycerol (latent and weak), erythritol (latent), D-mannitol, salicin, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, succinic acid (weak), and D-glucuronic acid (weak). Does not assimilate galactose, L-sorbose, lactose, melibiose, inulin, ethanol, ribitol, galactitol, D-glucitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, glucono- $\delta$ -lactone, DL-lactic acid, citric acid, inositol, or D-galacturonic acid.

Assimilates potassium nitrate. Does not assimilate sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, L-lysine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride.

Maximum growth temperature is 32-33°C.

Thiamin required for growth.

No starch-like substances are produced.

Growth does not occur on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar.

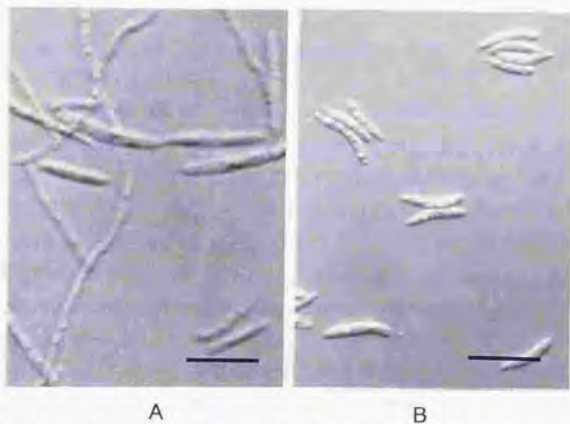
Urease positive.

Weakly Liquefy gelatin.

Does not hydrolyze fat.

The diazonium blue B reaction is positive.





A B  
Fig. 4.16. *Tilletiopsis penniseti* (K-139 = JCM 10216<sup>T</sup>). A: Vegetative cells grown in YM broth for 3 days at 25 °C. B: Ballistospores produced on corn meal agar after 6 days at 17 °C. Scales = 10  $\mu$ m.

The G+C content of nuclear DNA is 56.7 mol% (by HPLC).

The major ubiquinone is Q-10.

Xylose is absent in the cells.

Strains examined: The strain K-139, which was isolated from a dead leaf of *Pennisetum pediocellatum* collected by T. Nakase and B. Fungsin in Dec. 1987, Thailand, is the type strain of the species. This strain is deposited in Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama, as JCM 10216.

### 第三節 射出胞子形成酵母の分布と種多様性

#### 1. タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の分布 — 日本産およびニュージーランド産との比較 —

タイの植物から分離した射出胞子形成酵母を、本研究によって分類学的位置の明確になった種も含め、Table 4.20 に示した。また、Table 4.21 に射出胞子形成酵母の分布について試料毎に記した。1987年分離の射出胞子形成酵母63株は15種に同定された。また、1990年分離の73株は13種に同定された。このうち、新種は31株(136株中)で、23%を占めた。2度にわたる分離の内、2回共に分離された種は *Bullera crocea*, *B. pseudoalba*, *B. sinensis*, *B. variabilis*, *Kockovaella thailandica*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *S. shibatanus*, *S. vermiculatus* であった。これらの種の分離源を見ると、特定の植物に分布しているというわけではなく、タイの首都バンコクの西北部郊外、またはバンコク郊外南西部の海岸付近で採集した複数の植物である。従って、これらの種はバンコク付近では普遍的な種であると推定される。

一方、*Bensingtonia musae*, *Bullera alba*, *B. penniseticola*, *Kockovaella imperatae*, *K. sacchari*, *Sporobolomyces blumeae*, *Tilletiopsis penniseti* など、多数の分離株中、1株しか得られなかった株も存在する。*Bullera alba* を除いて、これらは本研究の結果、新種となった株である。2度の分離で多くの射出胞子形成酵母が分離された中、これらの種が1株ずつしか分離されなかった要因は、大きく分けて以下の3つが考えられる：(I) これらの種が希少種で、基質である植物体上に稀にしか存在しない。(II) 射出胞子の形成が少ないため、捕集用の培地上への胞子の落下があまり起こらない。(III) 分離の際、用いた条件(水分、時間、温度など)がその株の射出胞子の形成に適切ではなかった。本研究では、射出胞子形成酵母の分離に際して、本章の最初に述べたとおり、射出胞子捕集法を用いている。本方法は試料上に棲息する酵母が形成した射出胞子を培地上に捕集するため、分離の結果は、必ずしも、射出胞子形成酵母の分布を示すものではない。そのため、本同定結果から、当該種が希少種であるかどうか議論することはできない。また、これら新種の培養株の特徴をみると、特に射出胞

Table 4.20. Ballistoconidium-forming yeasts isolated from leaves in Thailand

Species	No. of isolates		Frequency <sup>1)</sup>
	1987	1990	
<i>Bensingtonia musae</i> *	1	K-304	0.74%
<i>Bullera alba</i>	1	K-29	0.74%
<i>Bullera crocea</i>	8	K-27, K-39, K-84, K-85, K-99, K-114, K-117, K-122, K-204, K-274	7.35%
<i>Bullera penniseticola</i> *	1	K-272	0.74%
<i>Bullera pseudoaiba</i>	4	K-15, K-54, K-87, K-100, K-203, K-297, K-336	5.15%
<i>Bullera sinensis</i>	11	K-3, K-52, K-53, K-59, K-62, K-76, K-79, K-101, K-111, K-119, K-123, K-233, K-242, K-243, K-244, K-255, K-259, K-271, K-273, K-279, K-281, K-285, K-292, K-302, K-305, K-322, K-327, K-328, K-331, K-338, K-339, K-342, K-345, K-349, K-351, K-368, K-369, K-373, K-379, K-389, K-408	30.15%
<i>Bullera variabilis</i>	5	K-80, K-121, K-129, K-140, K-152	3.68%
<i>Kockovaella imperatae</i> *	1	K-97	0.74%
<i>Kockovaella sacchari</i> *	1	K-337	0.74%
<i>Kockovaella thailandica</i> *	2	K-35, K-94, K-308, K-311	2.94%
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	1	K-41, K-261, K-262, K-276, K-286, K-289, K-300, K-325, K-334	6.62%
<i>Sporobolomyces blumeae</i> *	1	K-230	0.74%
<i>Sporobolomyces ryalandi</i> *	3	K-77, K-81, K-105	2.21%
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i> *	8	K-316, K-332, K-335, K-344, K-346, K-353, K-354, K-362	5.88%
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	6	K-56, K-82, K-83, K-103, K-110, K-124, K-298, K-299	5.88%
<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	10	K-2, K-20, K-21, K-32, K-38, K-57, K-63, K-64, K-107, K-116, K-215, K-226, K-237, K-245, K-283, K-290, K-382, K-384, K-390, K-394, K-399, K-401, K-414	16.91%
<i>Sporobolomyces verticillatus</i> *	7	K-17, K-19, K-90, K-91, K-92, K-93, K-109, K-383	5.88%
<i>Tilletiopsis dextri</i> *	2	K-125, K132	1.47%
<i>Tilletiopsis flava</i>	1	K-95	0.74%
<i>Tilletiopsis penniseti</i> *	1	K-139	0.74%
Total	63	73	100%

\* , new species

<sup>1)</sup> , Frequency = No. of isolates (1987+1990) / Total isolates

Table 4.21. Distribution of ballistoconidium-forming yeasts on leaf samples

isolated in 1987.

Species	1. <i>Panicetum pedicelatum</i>	5. <i>Impatiens cylindrica</i>	7. <i>Typha angustifolia</i>	8. <i>Samanea saman</i>	9. <i>Oryza</i> sp.	10. <i>Oryza sativa</i>	11. <i>Azaranthos comosus</i>	15. <i>Typha angustifolia</i>	19. <i>Musa sapientum</i>	31. <i>Oryza sativa</i>	32. <i>Saccharum spontaneum</i>	33. <i>Impatiens cylindrica</i>	34. <i>Phragmites karka</i>	35. <i>Phragmites karka</i>	36. <i>Oryza sativa</i>	37. <i>Oryza sativa</i>	38. <i>Oryza sativa</i>	39. <i>Cyperus cyperus</i>	40. <i>Oryza sativa</i>	41. <i>Oryza sativa</i>	42. <i>Oryza sativa</i>	Total				
<i>Bullera alba</i>					K-29																					
<i>Bullera crocea</i>					K-27	K-39					K-84, K-85		K-99				K-114	K-117	K-122				8			
<i>Bullera pseudoalba</i>											K-97													4		
<i>Bullera sinensis</i>	K-3	K-15						K-54																11		
<i>Bullera variabilis</i>	K-140							K-52, K-53	K-59, K-62	K-76, K-79														5		
<i>Kockovaella imparatae</i>																									1	
<i>Kockovaella thalassica</i>						K-35																			2	
<i>Sporidobolus ruineniae</i>							K-41																		1	
<i>Sporobolomyces nylandii</i>																										1
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>																										3
<i>Sporobolomyces shibatae</i>	K-2																									6
<i>Sporobolomyces vermiculatus</i>																										10
<i>Tilletiopsis danzii</i>																										7
<i>Tilletiopsis flava</i>																										2
<i>Tilletiopsis pammiselli</i>																										1
(continued)																										1



子の形成能が少ないという印象は与えない。しかしながら、天然基質から分離の場合と培養株の場合の、胞子形成能の差異について比較することはできない。従って、いくつかの種において分離頻度が少なかった要因を、現在のデータから類推することはできないが、上記3つが組合わさったものと推定される。結果として1株ずつしか分離できなかった *Bensingtonia musae*, *Bullera penniseticola*, *Kockovaella imperatae*, *K. sacchari*, *Sporobolomyces blumeae*, *Tilletiopsis penniseti*などは、今後、分類学の研究の上で、貴重な株であると思われる。

Table 4.22 は、タイの射出胞子形成酵母の分布と、現在までに理化学研究所微生物系統保存施設で行われてきた、日本各地、およびニュージーランドにおける分布を比較したものである。日本およびニュージーランドの分離の結果については Appendix 2 および 3 にまとめた通りである (Hamamoto and Nakase, 1995, 1996; Nakase and Suzuki, 1985, 1986a-c, 1987a-c, 1988; Nakase et al., 1987a-b, 1989, 1990a, 1990b, 1994)。試料の数が限られており、また、分離に射出胞子捕集法を用いているため、本結果は生物相を直接表すものではないが、射出胞子形成酵母の多様性についていくつかの知見が得られた。

既知の種と同定または新種として発表された54種の内、3カ国のいずれからも分離されたのは、*Bullera alba*, *B. crocea*, *B. variabilis* および *Sporobolomyces shibatanus* の4種だけであった。また、54種の内、42種は一カ国のみで分離されていた。*Bullera pseudoalba*, *B. sinensis* および *Sporobolomyces salmonicolor* はタイと日本の両国から分離されたが、ニュージーランドからは分離されなかった。特に、*B. sinensis* はタイの射出胞子形成酵母が得られた試料54点の内、29点(54%)から分離されており (Table 4.21)、タイにおいては普遍的な種と推定されるが、日本の試料からは分離総数の1.3%。またニュージーランドの試料からは分離されなかった。*Bensingtonia naganensis*, *Sporobolomyces inositolophilus*, *S. roseus*, *S. sasicola* および *Udeniomyces piricola* は日本、およびニュージーランドの植物から分離されたが、タイの植物からは分離されなかった。*S. roseus* の分離の報告は多く、従来、射出胞子形成酵母の中では普遍的な種であるとされてきた。本研究室における研究でも、日本の場合、分離総数の31%、ニュージーランドからも14%の割合で分離されている。しかし、タイの試料からは一株も分離されなかった。一方、タイの植物から比較的多く分離された *Sporid. ruineniae* は日本、およびニュージーランドの植物からは分離されなかった。また、タイとニュージーランドの両国間だけに共通の種は存在しなかった。

これら射出胞子形成酵母の分布の差が、菌株の生育温度と関係が深いのではないかと推定し、比較を行った (Table 4.23)。なお、Table 4.23 は系統樹のクラスター毎にまとめた (Fig. 4.4 および Fig. 4.8)。サブクラスター2aの種は生育最高温度が30°C以下のものが多く、タイの植物から分離されたのは *B. musae*

Table 4.22. Frequency of isolation of ballistoconidium-forming yeasts in Thailand, Japan and New Zealand

Scientific name	Thailand		Japan		New Zealand	
	Fre- quency	No. of isolates	Fre- quency	No. of isolates	Fre- quency	No. of isolates
<i>Bensingtonia ingoldii</i> *					1.1%	(1)
<i>Bensingtonia intermedia</i> *			0.9%	(2)		
<i>Bensingtonia miscanthi</i> *			0.9%	(2)		
<i>Bensingtonia musae</i> *	0.7%	(1)				
<i>Bensingtonia naganoensis</i> *			0.4%	(1)	1.1%	(1)
<i>Bensingtonia subrosea</i> *			0.4%	(1)		
<i>Bensingtonia yamatoana</i> *			3.9%	(9)		
<i>Bullera alba</i>	0.7%	(1)	7.9%	(18)	11.6%	(11)
<i>Bullera coprosmaensis</i> *					1.1%	(1)
<i>Bullera crocea</i>	7.4%	(10)	12.2%	(28)	6.3%	(6)
<i>Bullera hannaie</i> *					1.1%	(1)
<i>Bullera hulaensis</i> *					1.1%	(1)
<i>Bullera miyagiana</i> *			0.4%	(1)		
<i>Bullera mrakii</i> *					3.2%	(3)
<i>Bullera oryzae</i> *			2.2%	(5)		
<i>Bullera penniseticola</i> *	0.7%	(1)				
<i>Bullera pseudoalba</i> *	5.1%	(7)	1.7%	(4)		
<i>Bullera sinensis</i>	30.1%	(41)	1.3%	(3)		
<i>Bullera unica</i> *					1.1%	(1)
<i>Bullera vanabilis</i> *	3.7%	(5)	6.1%	(14)	4.2%	(4)
<i>Kockovaella imperatae</i> *			0.7%	(1)		
<i>Kockovaella sacchari</i> *			0.7%	(1)		
<i>Kockovaella thailandica</i> *			2.9%	(4)		
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	6.6%	(9)				
<i>Sporobolomyces blumeae</i> *	0.7%	(1)				
<i>Sporobolomyces coprosmae</i> *					1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces coprosmicola</i> *					2.1%	(2)
<i>Sporobolomyces dimmenae</i> *					5.3%	(5)
<i>Sporobolomyces dracophilus</i> *					1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces falcatus</i> *			0.4%	(1)		
<i>Sporobolomyces gracilis</i>					1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces griseoflavus</i> *			0.9%	(2)		
<i>Sporobolomyces inositophilus</i> *			0.4%	(1)	1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces lactophilus</i> *			1.7%	(4)		
<i>Sporobolomyces linderiae</i> *			0.4%	(1)		
<i>Sporobolomyces novaezealandicus</i> *					6.3%	(6)
<i>Sporobolomyces nylandii</i> *	2.2%	(3)				
<i>Sporobolomyces oryzicola</i> *			0.4%	(1)		
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i> *	5.9%	(8)				
<i>Sporobolomyces roseus</i>			31.4%	(72)	13.7%	(13)
<i>Sporobolomyces ruber</i> *			0.4%	(1)		
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	5.9%	(8)	0.9%	(2)		
<i>Sporobolomyces sasicola</i>			0.4%	(1)	1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces shibatarus</i>	16.9%	(23)	2.6%	(6)	3.2%	(3)
<i>Sporobolomyces subbrunneus</i> *			0.4%	(1)		
<i>Sporobolomyces taupoensis</i> *					1.1%	(1)
<i>Sporobolomyces vermiculatus</i> *	5.9%	(8)				
<i>Sporobolomyces xanthus</i> *			0.4%	(1)		
<i>Tilletiopsis dextrii</i> *	1.5%	(2)				
<i>Tilletiopsis flava</i>	0.7%	(1)				
<i>Tilletiopsis lilacina</i>			2.6%	(6)		
<i>Tilletiopsis penniseti</i> *	0.7%					
<i>Tilletiopsis</i> sp.					30.5%	(29)
<i>Udeniomyces megalosporus</i> *			15.3%	(34)		
<i>Udeniomyces piricola</i>			2.6%	(6)	1.1%	(1)
	100.0%	(136)	100.0%	(229)	100.0%	(95)

\* reported as new species.  
For references, see Appendixes 2 and 3.

Table 4.23. Frequency of isolation of ballistoconidium-forming yeasts in Thailand, Japan and New Zealand

Sub-cluster	Scientific name	Thailand		Japan		New Zealand		Growth at <sup>b</sup>		
		Frequency	No. of isolates	Frequency	No. of isolates	Frequency	No. of isolates	30C	25C	20C
1b	<i>Tilletiopsis dextrii</i> *	1.5%	(2)					+	+	+
	<i>Tilletiopsis flava</i>	0.7%	(1)					+	+	+
	<i>Tilletiopsis klacina</i>			2.6%	(6)			v	+	+
	<i>Tilletiopsis penniseti</i> *	0.7%						+	+	+
2a	<i>Bensingtonia ingoldii</i> *					1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Bensingtonia miscanthi</i> *			0.9%	(2)			-	+	+
	<i>Bensingtonia musae</i> *	0.7%	(1)					+	+	+
	<i>Bensingtonia naganensis</i> *			0.4%	(1)	1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Bensingtonia subrosea</i> *			0.4%	(1)			-	+	+
2b	<i>Sporobolomyces dracophilus</i> * <sup>11</sup>					1.1%	(1)	-	-	-
	<i>Sporobolomyces sasicola</i> <sup>11</sup>			0.4%	(1)	1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Sporobolomyces taupoensis</i> * <sup>11</sup>					1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Sporobolomyces xanthus</i> *			0.4%	(1)			+	+	+
	<i>Bensingtonia intermedia</i> *			0.9%	(2)			-	+	+
	<i>Bensingtonia yamatoana</i> *			3.9%	(9)			-	+	+
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> <sup>11</sup>	6.6%	(9)					+	+	+
	<i>Sporobolomyces blumeae</i> *	0.7%	(1)					+	+	+
	<i>Sporobolomyces falcatus</i> * <sup>11</sup>			0.4%	(1)			+	+	+
	<i>Sporobolomyces griseoflavus</i> * <sup>11</sup>			0.9%	(2)			-	+	+
2c	<i>Sporobolomyces inositophilus</i> * <sup>11</sup>			0.4%	(1)	1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Sporobolomyces nylandii</i> *	2.2%	(3)					+	+	+
	<i>Sporobolomyces poonsookiae</i> *	5.9%	(8)					+	+	+
	<i>Sporobolomyces roseus</i>			31.4%	(72)	13.7%	(13)	v	+	+
	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> <sup>11</sup>	5.9%	(8)	0.9%	(2)			v	v	+
	<i>Sporobolomyces shibatanus</i> <sup>11</sup>	16.9%	(23)	2.6%	(6)	3.2%	(3)	+	+	+
	<i>Sporobolomyces coprosmae</i> * <sup>11</sup>					1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Sporobolomyces gracilis</i> <sup>11</sup>					1.1%	(1)	-	v	+
	<i>Sporobolomyces oryzicola</i> * <sup>11</sup>			0.4%	(1)			+	+	+
	<i>Sporobolomyces vermiculatus</i> *	5.9%	(8)					+	+	+
3a	<i>Udeniomyces megalosporus</i> *			15.3%	(34)			-	+	+
	<i>Udeniomyces picicola</i>			2.6%	(6)	1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Bullera alba</i>	0.7%	(1)	7.9%	(18)	11.6%	(11)	+	+	+
	<i>Bullera coprosmaensis</i> *					1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Bullera crocea</i>	7.4%	(10)	12.2%	(28)	6.3%	(6)	-	+	+
	<i>Bullera hannaie</i> *					1.1%	(1)	-	+	+
	<i>Bullera huiagensis</i> *					1.1%	(1)	-	-	+
	<i>Bullera miyagiana</i> *			0.4%	(1)			+	+	+
	<i>Bullera mrakii</i> *					3.2%	(3)	-	+	+
	<i>Bullera oryzae</i> *			2.2%	(5)			+	+	+
3b	<i>Bullera penniseticola</i> *	0.7%	(1)					+	+	+
	<i>Bullera pseudoalba</i> *	5.1%	(7)	1.7%	(4)			+	+	+
	<i>Bullera sinensis</i>	30.1%	(41)	1.3%	(3)			+	+	+
	<i>Bullera unica</i> *					1.1%	(1)	+	+	+
	<i>Bullera variabilis</i> *	3.7%	(5)	6.1%	(14)	4.2%	(4)	v	+	+
	<i>Kockovaella imperatae</i> *	0.7%	(1)					-	+	+
	<i>Kockovaella sacchari</i> *	0.7%	(1)					+	+	+
	<i>Kockovaella thailandica</i> *	2.9%	(4)					+	+	+

\* reported as new species.

<sup>11</sup> For phylogenetic position, Hamamoto and Nakase (in preparation).

<sup>12</sup> Boekhout and Nakase (1998a, 1998b, 1998c); Nakase et al. (1991).

For references, see Appendixes 2 and 3.



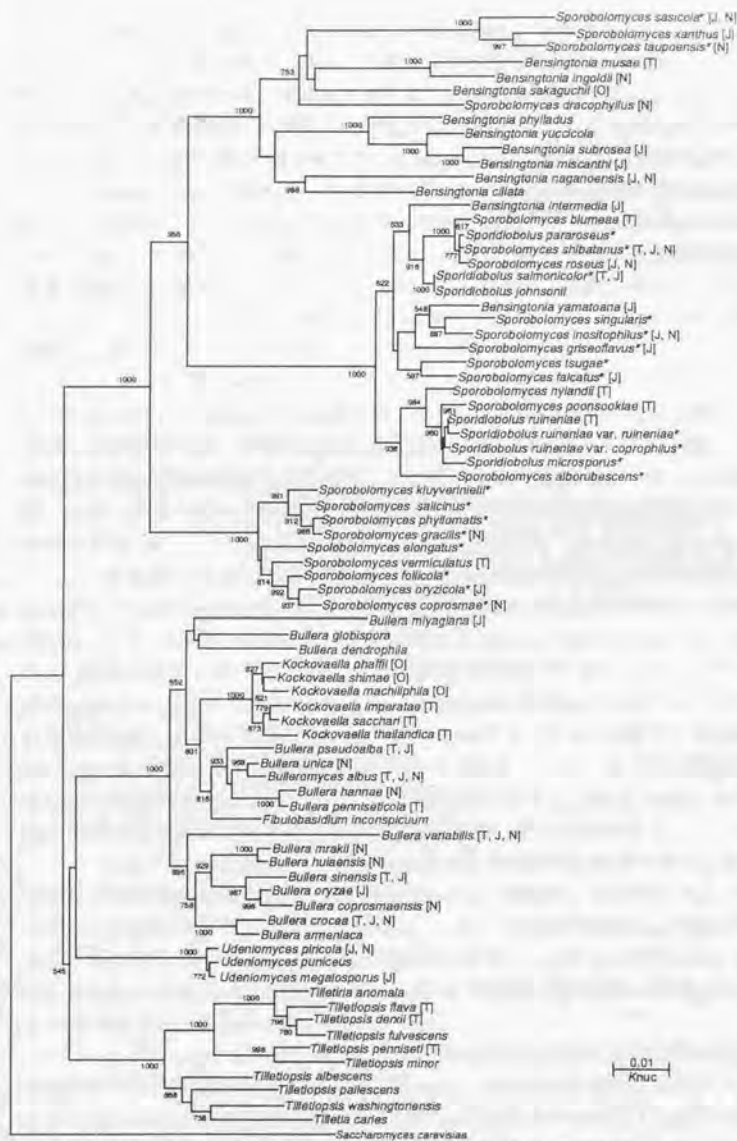


Fig. 4.17. Phylogenetic tree of ballistoconidium-forming yeasts based on 18S rDNA sequences.

The tree was constructed from the evolutionary distance data according to Kimura (1980) based on 1562 positions, using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with bootstrapping (Felsenstein, 1985). The numerals represent the confidence level from 1,000 replicate bootstrap sampling. \*, Hamamoto and Nakase (in preparation). Brackets indicate the locality of samples: T, Thailand; J, Japan; O, The Ogasawara Islands; N, New Zealand.

だけで、他は日本およびニュージーランドの試料から分離されたものであった。一方、サブクラスター2bには30°Cで生育できる種も多く含まれており、タイの植物から分離したサビキン綱酵母の多くは、2bに位置していた。生育温度を比較すると、タイの植物から分離された種は*B. crocea* および*K. imperatae*を除き、すべて30°Cでの生育が可能であった。*K. imperatae*も29°Cでの生育が確認されている(Nakase et al., 1991)。一方、表の中の、25°Cで生育できない*S. dracophilus*、*B. hanna* および*B. huiaensis*の3株はいずれもニュージーランドだけから分離されており、日本からも分離されていない。また、30°Cで生育可能な種の内、複数の国から分離されているものは、国によって分離の頻度が異なっていた。これらのことから、菌株の生育温度(生育最高温度および至適生育温度)は棲息可能な地域を限定する、重要な要因であると推定される。

これらの種を系統樹にまとめたところ(Fig. 4.17)、日本、ニュージーランドおよびタイの植物からの分離結果、および小笠原の植物からの分離した射出胞子形成酵母の内、分類学および系統学的位置の明らかになった種の中で、国に固有の系統枝は存在しなかった。しかし、系統樹上でも、いわゆる温帯地域(日本、ニュージーランド)と熱帯(タイ)という視点から比較を行うことが可能であった。

本研究において新種であることが明らかになった、*Sporobolomyces nylandii*、*S. poonsookiae*は*Sporid. ruineniae*と近縁で生理生化学的性状も類似している。また、*Sporid. ruineniae* var. *ruineniae*と*Sporid. ruineniae* var. *coprophilus*の2変種が認められているが、これらの基準株はそれぞれ、インドネシア(Holzschu et al., 1981)およびパキスタン(Sugiyama and Goto, 1967)より分離された種である。*Sporid. ruineniae* var. *ruineniae*のシノニムとされていた*Sporid. microsporus*はジャマイカから分離された株である。これらとタイの植物から*Sporid. ruineniae*の分離が多かったことを考え合わせると、*Sporid. ruineniae*に近縁な菌群はこの地域に普遍的にみられる種ではないかと推定される。

次に、タイの植物から分離され、分生子形成様式の新規性をもとに、新属として報告された*Kockovaella*属(Nakase et al., 1991)は、日本およびニュージーランドの植物からは分離されていない。一方、小笠原の植物から分離した射出胞子形成酵母には*Kockovaella*属が含まれており、これらは3新種として報告した(Cañete-Gibas et al., 1998)。*Kockovaella*属も熱帯、亜熱帯等の温度域に存在する種であると推定される。

以上のことから、日本、ニュージーランドおよびタイの植物から分離した射出胞子形成酵母を系統面から比較すると、系統樹の上で小さなクラスターとして現れる系統的に近縁な菌群は、類似した温度域から分離されたものが多いという結果が得られた。したがって、別の温度域を探索すれば、さらに新たな系統の種が発見されると予想される。これは、本研究は種の多様性の探求に

新たな知見を与えたという意味で非常に意義深いものである。

（以下、本文の大部分は非常に薄い文字で印刷されており、ほとんど読み取ることができません。内容は、上記の文脈に基づいて推測される学術的な議論の連続です。）

1. 分子系統学的アプローチの分類学への適用

第一章に述べたように、“The most perfect classification is a natural one, that is to say a classification based on phylogeny.”という Lodder (Lodder, 1970)の言葉が示す通り、分類学者の志す分類は系統関係に基づいた自然分類である。系統に従った分類体系を構築するために、分類学者たちは、常に、従来の分類に系統を反映すると思われる新しい手法を取り入れ、多くの分類群にこれを適用し、データを蓄積、そして分類指標としての位置を評価する、という過程を繰り返して行ってきた。従来、菌類、とりわけ酵母のように、形態の分化が乏しく、また、化石などの資料のない生物の分類は、その特徴の少ない形態と、糖の発酵性、炭素源および窒素源の資化性、ビタミンの要求性など、生理生化学的性状に基づいて行われてきた (例えば Kurtzman and Fell, 1998)。一方、生体成分に基づく化学分類学的性状に基づくアプローチも行われた。しかし、真核生物である酵母の場合、細菌で見られるような多様性が認められなかったため、現在では、キシロースの有無と主要ユビキノ系などが指標として用いられている。近年、PCR や電気泳動技術の発達により、18S rRNA などの遺伝子の塩基配列が比較的容易に決定できるようになった。そして、これら塩基配列を基に生物の系統解析を行う、分子系統学が発達した。塩基配列を直接扱う分子系統学は、自然分類を望む分類学者に歓迎され、従来の分類指標である形態的性状や化学分類学的性状などとの対比が盛んに行われた。その結果、形態に基づく従来の菌類の高次分類は、必ずしも系統を反映しているとはいえない部分が多く、再構築がのぞまれている現況である。

現在では、系統関係の推定的手段として、18S rDNA などリボソームの遺伝子が主に使用されている。これは、原核生物、真核生物を問わず、すべての生物種に分布していること、また、進化速度が適当であることがその理由である。生物種全体における菌類の位置、あるいは菌類の大まかな系統関係を推定することを目的とした初期においては、この選択は正しいものであったと思われる。しかし、さらに詳細な、例えば種と種の、あるいは同一種内の系統関係の解明も望まれる現在においては、18S rDNA では不十分な場合も多い。近縁な菌株同士の比較では、OTU の数や内容、外群の設定の仕方などによって、樹形が変わる場合が多いからである。最近では、他の遺伝子を用いて系統関係を類推する試みも行われ、細菌においては *gyrB* が、18S rDNA よりも近縁な関係を議論するのに適しているといわれている (Yamamoto and Hayakawa, 1996)。また、真核生物では、同じリボソーム遺伝子であるが、18S と 26S の間の ITS 領域が注目されている (James et al., 1996)。

18S rDNA のデータの充実度を見ると、本研究室における研究により、

射出胞子形成酵母は全種の基準株の塩基配列が決定された。他の担子菌系酵母においては、*Trichosporon* 属以外は、各属の代表的な一部の種しかデータが整っていないのが現状で、現段階では担子菌系酵母あるいは担子菌全体の系統学的類縁関係について議論することはできない。しかし、第二章で述べたように、射出胞子形成酵母は担子菌類のどの綱にも位置している。特にサビキン綱においては、射出胞子形成酵母は系統的に非常に多様であり、担子菌全体と同じ多様性を示していると推定された。同時に、各綱の中のサブクラスターは、それぞれの塩基配列間の遺伝距離から、目あるいは亜目に相当するものであると推察された。担子菌系酵母の高次分類は混沌とした状態であると上述したが、これは、報告されている種数が少なく、従って、系統的に離れている種間を対象に、共通の性状を見出そうとしているところに問題があるのではないかと思われる。今後、さらに新たな酵母の分離を行い、表現形質と系統学的なデータの両面を整えていくことによって、自ずから自然分類が明らかになってくるのではないかと思われる。

## 2. グルーピング手段としての 18S rDNA および ITS とその系統分類学的意義

分類学における基本単位は「種」である。そして、真核生物においては、生物学的種の概念が「種」の基本である。現在の酵母の分類では、生物学的「種」と DNA-DNA 交雑実験の相同値の対比から、「種」に対する分類指標はある程度明確になってきたと考えられている(Price et al., 1978)。一方、上述したように、18S rDNA などの塩基配列に基づく系統解析が行われるようになり、生物種全体の中で、あるいは、菌類の中でのおおまかな位置も明らかとなってきている。しかし、種と綱の間の属、科、門などの分類群を規定する明らかな指標はないのが現状である。

近年、ITS 領域が、近縁な菌株間の系統をよく反映しているのではないかと注目をあつめている (James et al., 1996)。本研究においても、ITS 領域の塩基配列を決定し、近縁と推定される菌株間の配列を比較した。その結果、ITS1の方が、ITS2よりも進化速度が速いことが推定された。また、DNA 相同性と比較すると、ITS1の配列が同一のグループの株は DNA 相同性も高い値を示した。従って、18S rDNA 塩基配列が近縁なクラスター (0.01 *K*nuc)においては、DNA-DNA 交雑実験の前段階としてのグルーピングに ITS1 の利用が有意義と思われる。しかしながら、DNA 相同性の値がいわゆる中間値といわれる 50-60%の菌株間においても、ITS1の塩基配列は一致していた。また、Hamamoto と Nakase (1995)によって、DNA 相同性が 45 - 48%であることから別種と結論づけられている *S. oryzycola* と *S. coprosmae* の間では、*S. coprosmae* に 1塩基の挿入が認められた。これらの結果は、ITS1の配列が同一ならば DNA 相同値がいわゆる中間値以上の可能性があることを示唆するものである。しかしながら、*S. oryzycola*

と *S. coprosmae* の例のように、たとえば1塩基の違いのある場合、同種であるか、別種であるかの区別は、現在の段階では明らかではない。以上から、ITS1の塩基配列のみを用いて同定を行うことに関しては、まだ、検討の余地があると思われる。

現段階での担子菌系酵母の正確な分類・同定方法としては、まず、供試株の18S rDNAの保存領域の塩基配列の決定が有効であろう。これに基づき、供試株がどの網に位置するか、そしてその内のどのサブクラスターに位置するか推定することが可能である。しかし、射出胞子形成酵母の18S rDNA塩基配列データはあるものの、その他の関連菌株のデータは十分ではない。従って、そのサブクラスターに位置する関連菌株との分類学的データの比較を行った後、ある種と同定、または新種として提唱するのが妥当であると思われる。ITSのデータのある菌群に対しては、18S rDNAの塩基配列の決定後、同一サブクラスター中のITSの比較を行うことが可能である。このように、各分野において重要な菌類の迅速な同定および分類のためにも、18S rDNAおよびITSなどのデータの充実が必須である。

### 3. 細胞壁糖組成に基づくグルーピングと系統分類学的意義

上述したように、担子菌系酵母の高次分類は混沌とした状態であるといわれている。従来、担子菌類の分類で非常に重要であるとされてきた、担子器の形態をはじめ、主要ユビキノンのような化学分類学的性質も系統樹と必ずしも一致しない部分もある。一方、本研究で行った細胞壁糖組成に基づくグルーピングは担子菌類の系統をよく反映しており、担子菌類の分類における重要な形質である。従来、サビキン綱の菌類は一般にフコースを含むといわれてきた。しかし、本研究の *Sporobolomyces* 属の細胞壁糖組成と18S rDNA塩基配列に基づく解析から、サビキン綱内のサブクラスターの一つがフコースを含まないことが確認された。これは、今後、担子菌類の高次分類群を識別する形質として、分類指標の一つに採用されるべきであると思われる。

第二章で述べたように、担子菌類の系統樹において、3つの綱による樹形は、アラインメントの仕方や、各綱のOTUの数や内容による影響によって変わることがある。Fig. 2.3では、まず、クロボキン綱とサビキン綱がクラスターを形成し(ブーツストラップ27%)、次に菌茸綱がこの2綱とクラスターを形成した。しかし、Fig. 4.5およびFig. 4.8ではクロボキン綱と菌茸綱(ブーツストラップ68%, Fig. 4.5; 同55%, Fig. 4.8)が最初にクラスターを形成した。これらブーツストラップの数値は、現在の18S rDNA塩基配列のデータからは、未だ、担子菌類の3つの綱による樹形を考察することが難しいことを示唆するものである。しかし、クロボキン綱と菌茸綱は、細胞壁の主要構成糖がグルコースであるのに対し、サビキン綱はマンノースである。また、主要構成糖がグルコー

スのグループがキシロースの有無によって二分されるように、主要構成糖がマンノースのグループは、フコースの有無によって二分された。これらのことから、表現形質の一つである細胞壁糖組成は、クロボキン綱と菌草綱が最初にクラスターを形成する樹形を支持することが明らかとなった。

#### 4. タイ産射出胞子形成酵母の分布と日本およびニュージーランドとの比較

上記結果をふまえ、熱帯であるタイの植物から分離した射出胞子形成酵母の同定を行った。同時に、射出胞子形成酵母の分布を調べ、日本産およびニュージーランド産射出胞子形成酵母との比較を行った。1987年分離の射出胞子形成酵母63株は15種に同定された。また、1990年分離の73株は13種に同定された。これらの内、*Bensingtonia musae*、*Bullera penniseticola*、*Kockovaella thailandica*、*K. imperatae*、*K. sacchari*、*Sporobolomyces blumeae*、*S. nylandii*、*S. poonsookiae*、*S. vermiculatus*、*Tilletiopsis dextrii* および *T. penniseti* の11種はタイの植物から分離された新種であった。“The yeasts”, 第4版 (Kurtzman and Fell, 1998)に掲載されている射出胞子形成酵母の総数は12属60種 (*Kockovaella thailandica* および *K. imperatae* を含む) で、その多くは温帯の植物からの分離されている(第四章)。熱帯であるタイの植物からは、既知の種が多く分離された(77%)が、新種や希少種と思われる種(23%)も分離された。これは、射出胞子形成酵母における種多様性を示唆するものである。

タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の分布について、日本各地およびニュージーランドと比較を行った。日本各地、およびニュージーランドの植物からは *Bullera alba*、*B. crocea* および *Sporobolomyces roseus* が多く分離されていた。これらの内、タイの植物からは *B. alba* は1株のみ分離され、また *S. roseus* は分離されなかった。一方、タイの植物から多く分離された *Sporidiobolus ruineniae* は日本、およびニュージーランドの植物からは分離されなかった。これら射出胞子形成酵母の分布は、菌株の生育温度と関係が深いのではないかと推定し、比較を行ったところ、菌株の生育温度(生育最高温度および至適生育温度)は棲息可能な地域を限定する、重要な要因であると推定された。日本、ニュージーランドおよびタイの植物から分離した射出胞子形成酵母を分子系統面から比較すると、各国に固有の系統枝は存在しなかったものの、系統的に近縁な菌群は、温度域の類似したものが多く示唆された。従って、生物の種多様性を考察する上で、棲息環境の温度は重要な要因であると推察され、別の温度域を探索すれば、さらに新たな系統が発見されると予測された。

本研究は、混沌とした担子菌系酵母の高次分類群に対して、多様な種に対応する系統分類を行うため、新たな種を分離し、酵母の多様性を広げる一方で、これらの種の系統を反映する新たな表現形質の探索を行ったものである。

特に、細胞壁糖組成は分類学的にも系統的にも重要な形質であることが示された。本研究によって得られた結果は、担子菌類の新たな分類体系の構築のために、極めて有用なものであると考える。



## 謝辞

本論文の作成を終えるに当たり、御懇切なる御指導、御助言を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所教授 杉山純多先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に終始御指導を賜りました、理化学研究所培養生物部 中瀬崇部長に深謝いたします。

本研究に対して、御指導をいただきました、元理化学研究所ライフサイエンス培養生物部部長、現東京農業大学教授 駒形和男先生に深く感謝いたします。また、暖かい励ましをいただきました、元(財)発酵研究所所長 長谷川武治先生ならびに飯島貞二先生に厚くお礼申し上げます。

細胞壁糖組成の分析に関して、御助言をいただきました、東京大学分子細胞生物学研究所助教授 横田明先生に深く感謝致します。

貴重な菌株を御提供いただき、また、本研究を長年にわたり御支援いただいた、タイ国科学技術研究所副所長Ms. Poonsook Athasampunnaをはじめ、所員の方々に深く感謝致します。

本研究を行うに当たり、終始御支援をいただきました、理化学研究所培養生物部系統保存室 鈴木健一朗室長、ならびに同分類室 辨野義己室長をはじめ、培養生物部の皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

- Attasampunna, P., Fungsin, B., Potacharoen, W., Nakase, T., Itoh, M. and Komagata, K. 1989. Ballistospore-forming yeasts found in Thailand. 5th Int. Symp. Microb. Ecol., Kyoto, Abstracts p. 129.
- Bandoni, R. J. 1979. *Fibulobasidium*: A new genus in the *Sirobasidiaceae*. Can. J. Bot. 57: 264-268.
- Bandoni, R. J. and Johri, B. N. 1972. *Tilletiaria*: A new genus in the *Ustilaginales*. Can. J. Bot. 50: 39-43.
- Banno, I. 1967. Studies on the sexuality of *Rhodotorula*. J. Gen. Appl. Microbiol. 13: 167-196.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22: 87-108.
- Bhattacharya, D., Surek, B., Rusing, M., Damberger, S. and Melkonian, M. 1994. Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Charophyceae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9916-9920.
- Bhattacharya, D., Friedl, T. and Damberger, S. 1996. Nuclear-encoded rDNA group I introns: Origin and phylogenetic relationships in insertion site lineages in the green algae. Mol. Biol. Evol. 13: 978-989.
- Blanz, P. A. and Gottschalk, M. 1984. A comparison of 5S ribosomal RNA nucleotide sequences from smut fungi. Syst. Appl. Microbiol. 5: 518-526.
- Boedijn, K. B. 1934. The genus *Sirobasium* in the Netherlands Indies. Bull. Jard. Bot. Buitenz., Ser. III, 13: 266-268.
- Boekhout, T. 1987. Systematics of anamorphs of *Ustilaginales* (Smut fungi) - a preliminary survey. Stud. Mycol. 30: 137-149.
- Boekhout, T. 1991a. A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. Stud. Mycol. 33: 1-194.
- Boekhout, T. 1991b. Systematics of *Itersonilia*: A comparative phenetic study. Mycol Res. 95: 135-146.
- Boekhout, T. 1998. *Tilletiopsis* Derx ex Derx. In: The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 848-853.
- Boekhout, T., Bandoni, R. J., Fell, J. W. and Kwon-Chung, K. J. 1998. Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. In: The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 609-625.
- Boekhout, T., Fonseca, A. and Batenburg-van der Vegte, W. H. 1991. *Bulleromyces* genus novum (Tremellales), a teleomorph for *Bullera alba*, and the occurrence of

- mating in *Bullera variabilis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 59: 81-93.
- Boekhout, T., van Gool, J., van den Boogert, H. and Jille, T. 1992a. Karyotyping and G+C composition as taxonomic criteria applied to the systematics of *Tilletiopsis* and related taxa. *Mycol. Res.* 96: 331-342.
- Boekhout, T. and Nakase, T. 1998a. *Bensingtonia* Ingold emend. Nakase & Boekhout. *In: The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 723-730.
- Boekhout, T. and Nakase, T. 1998b. *Bullera* Derx. *In: The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 731-741.
- Boekhout, T. and Nakase, T. 1998c. *Sporobolomyces* Kluver & van Niel. *In: The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 828-843.
- Boekhout, T., Yamada, Y., Weijman, A. C. M. Roeymans, H. J. and Batenburg-van der Veegte, W. H. 1992b. The significance of coenzyme Q, carbohydrate composition and ultrastructure for the taxonomy of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 1-10.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzales, D., Hibbett, D. S., Janc, D. J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W. G. and Sogin, M. L. 1992. Evolutionary relationship within the fungi: Analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 231-241.
- Buhagiar, R. W. M., Yarrow, D. and Barnett J. A. 1983. *Bullera crocea* and *Bullera armeniaca*, two new yeasts from fruit and vegetables. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3149-3155.
- Buller, A. H. R. 1933. *Sporobolomyces*, a basidiomycetous yeast-genus. *In: Researchers on fungi V*, ed. by Buller, A. H. R., Longmans, Green and Co., London, pp. 171-206.
- Burke, J. M., Belfort, M., Cech, T. R., Davies, R. W., Schweyen, R. J., Shub, D. A., Szostak, J. W., and Tabak, H. F. 1987. Structural conventions for group I introns. *Nucleic Acids Res.* 15: 7217-7221.
- Cañete-Gibas, C. F., Takashima, M., Sugita, T., and Nakase, T. 1998. Three new species of *Kockovaella* isolated from plants collected in the Ogasawara Islands. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 1-8.
- Cech, T. R. 1988. Conserved sequences and structures of group I introns: Building and active site for RNA catalysis - a review. *Gene* 73: 259-271.
- Cech, T. R., Damberger, S. H. and Gutell, R. R. 1995. Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Nature Structural Biology* 1: 273-280.
- Damberger, S. H. and Gutell, R. R. 1994. A comparative database of group I intron

- structures. *Nucleic Acids Res.* 22: 3508-3510.
- Davila-Aponte, J. A., Huss, V. A. R., Sogin, M. L., and Cech, T. R. 1991. A self-splicing group I intron in the nuclear pre-rRNA of the green alga, *Ankistrodesmus stipitatus*. *Nucleic Acids Res.* 19: 4429-4436.
- De Jonckheere, J. F. 1994. Evidence for the ancestral origin of group I introns in the SSU rDNA of *Naegleria* spp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 457-463.
- DePriest, P. T. and Been, M. D. 1992. Numerous group I introns with variable distributions in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *J. Mol. Biol.* 228: 315-321.
- Derx, H. G., 1930. Etude sur les Sporobolomycetes. *Annls. Mycol.* 28: 1-23.
- Derx, H. G., 1948. *Itersonilia*, nouveau genre des Sporobolomycetes a mycelium boucle. *Bull. Bot. Gdn Buitenzorg, Ser. III* 17: 465-472.
- DeWachter, R., Neefs, J.-M., Goris, A., and Van de Peer, Y. 1992. The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron. *Nucleic Acids Res.* 20: 1251-1257.
- Donk, M. A. 1972. The heterobasidiomycetes: A reconnaissance - I. A restricted emendation. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C*, 75: 365-375.
- Dujun, B. 1989. Group I introns as mobile genetic elements: Facts and mechanistic speculations - a review. *Gene* 82: 91-114.
- Fell, J. W., Boekhout, T. and Freshwater, D. W. 1995. The role of nucleotide sequence analysis in the systematics of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *Stud. Mycol.* 38: 129-146.
- Fell, J. W. and Statzell-Tallman, A. 1981. Heterothallism in the basidiomycetous yeast genus *Sporidiobolus* Nyland. *Curr. Microbiol.* 5: 77-82.
- Fell, J. W., Statzell, A., Hunter, I. L. and Phaff, H. J. 1969. *Leucosporidium* gen. nov. The heterobasidiomycetous stage of several yeasts of the genus *Candida*. *Antonie van Leeuwenhoek* 35: 433-462.
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference package) ver. 3.5c., distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fischer, B. and Brebeck, C., 1894. Zur Morphologie, Biologie und Systematik der Kalmpilze, der Monilia Candida Hansen und des Soorerregens. G. Fischer, Jena.
- Gargas, A., DePriest, P. T., and Taylor, J. W. 1995. Positions of multiple insertions in SSU rDNA in lichen-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 12: 208-218.
- Gast, R. J., Fuerst, P. A and Byers, T. J. 1994. Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. *Nucleic Acids Res.* 22: 592-596.

- Gokhale, A. A. 1972. Studies on the genus *Tilletiopsis*. *Nova Hedwigia* 23: 795-809.
- Hamamoto, M. and Nakase, T. 1995. Ballistosporous yeasts found on the surface of plant materials collected in New Zealand. 1. Six new species in the genus *Sporobolomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 151-171.
- Hamamoto, M. and Nakase, T. 1996. Ballistosporous yeasts found on the surface of plant materials collected in New Zealand. The genera *Bensingtonia* and *Bullera* with descriptions of five new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 279-291.
- Hamamoto, M. and Nakase, T. Phylogenetic relationships among basidiomycetous yeasts in the class Urediniomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA gene sequences: Diversity of the genus *Sporobolomyces*. (in preparation).
- Hartland, R. P., Vermeulen, C. A., Klis, R. M., Sieetsma, J. H. and Wessels, J. G. 1994. The linkage of (1-3)- $\beta$ -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1591-1599.
- Hasegawa, T. 1965. A report on the taxonomy of red to orange *Rhodotorula*. *Ann. Rep. Inst. Fermentation, Osaka* 2: 1-25.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-655.
- Hibbett, D. S. 1996. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 13: 903-917.
- Holzschu, D. L., Tredick, J. and Phaff, H. J. 1981. Validation of the yeast *Sporidiobolus ruinenii* based on its deoxyribonucleic acid relatedness to other species of the genus *Sporidiobolus*. *Curr. Microbiol.* 5: 73-76.
- Ingold, C. T. 1986. *Bensingtonia ciliata* gen. et sp. nov., a ballistospore fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 86: 325-328.
- James, S. A., Collins, M. D. and Roberts, I. N. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 189-194.
- Johnson-Reid, J. A. and Moore, R. T. 1972. Some ultrastructural features of *Rhodospiridium toruloides* Banno. *Antonie van Leeuwenhoek* 38: 417-435.
- Johri, B. N. and Bandoni, R. J. 1984. Taxonomy of the sporobolomycetous genus *Bullera*. *Proc. Int. Symp. Taxon. Fungi Madras (1973)* 2: 536-547.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. *In: Mammalian protein metabolism*. ed. by Munro, H. N., Academic Press, New York, pp. 21-123.
- Kiho, T., Ukai, S. and Hara, C. 1986. Simultaneous determination of the alditol acetate derivatives of amino and neutral sugars by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 369: 415-418

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kluyver, A. J. and Niel, C. B. van, 1924. Über Spiegelbilder erzeugende Hefearten und die neue Hefengattung *Sporobolomyces*. *Centrallbl. Bakt., Ser. II*, 63: 1-20.
- Kluyver, A. J. and Niel, C. B. van, 1927. *Sporobolomyces* - ein Basidiomycet? *Annls. Mycol.* 25: 389-394.
- Komagata, K. and Nakase, T. 1967. Microbiological studies on frozen foods. V. General properties of yeasts isolated from frozen foods (in Japanese). *J. Food Hyg. Soc. Japan* 8: 53-57.
- Kreger-van Rij, N. J. W., 1984. The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1991. Molecular relatedness between the basidiomycetous yeasts *Sporidiobolus ruinenii* and *Sporobolomyces coprophilus*. *Mycologia* 83: 107-110.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1998. The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kwon-Chung, K. J. and Popkin, T. J. 1976. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *J. Bacteriol.* 126: 524-528.
- Li, M. 1982. Studies on *Sporobolomycetaceae* 1. Taxonomy of *Bullera*. *Acta Microbiol. Sin.* 22: 17-25.
- Lodder, J. and Kreger-van Rij, N. J. W. 1952. The yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publ., Amsterdam.
- Lodder, J. 1970. The yeasts, a taxonomic study, 2nd ed. North-Holland Publ., Amsterdam.
- Lohweg, H. 1925. *Sporobolomyces* - kein Basidiomycet. *Annls Mycol.* 24: 91-202.
- Lott, T. J., Burns, B. M., Zancope-Oliveira, R., Elie, C. M. and Reiss, R. 1998. Sequence analysis of the international transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within the genus *Candida*. *Curr. Microbiol.* 36: 63-69.
- Lowy, B. 1968. Taxonomic problems in the Heterobasidiomycetes. *Taxon* 17: 118-127.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R. and Hill, D. R. A. 1994. *Goniomonas*: rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *Eur. J. Phycol.* 29: 29-32.
- Michel, F. and Westhof, E. 1990. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.*, 216: 585-610.
- Moore, R. T. 1972. Ustomycota, a new division of higher fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 38: 567-584.

- Moore, R. T. and Kreger-van Rij, N. J. W. 1972. Ultrastructure of *Filobasidium* Olive. *Can. J. Microbiol.* 18: 1949-1951.
- Musters, W., Boon K., Sande, C. A. F. M. van der, Heerikhuizen, H. van and Planta, R. J. 1990. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO J.* 9: 3989-3996.
- Nakagiri, A. and Tubaki, K. 1983. A taxonomic study of *Rhodosporidium capitatum*. *Can. J. Bot.* 61: 1898-1905.
- Nakase, T. and Boekhout, T. 1988. Emendation of the genus *Bensingtonia* Ingold. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34: 433-437.
- Nakase, T. and Itoh, M. 1988. Two new combinations of ballistospore-forming yeasts: *Sporobolomyces tsugae* comb. nov. and *Sporobolomyces salicinus* comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 499-502.
- Nakase, T., Itoh, M. and Sugiyama, J. 1989. *Bensingtonia ingoldii* sp. nov., a ballistospore-forming yeast isolated from *Knightia excelsa* collected in New Zealand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35: 53-58.
- Nakase, T. Itoh, M. and Suzuki, M. 1987a. *Sporobolomyces falcatus* sp. nov., isolated from a dead leaf of *Miscanthus sinensis* in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 28: 295-301.
- Nakase, T., Itoh, M., Suzuki, M. and Bandoni, R. J. 1990a. *Sporobolomyces lactophilus* sp. nov., a ballistospore-forming yeast isolated from *Abies firma* collected in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 31: 159-167.
- Nakase, T., Itoh, M., Takematsu, M. and Bandoni R. J. 1990b. *Bullera miyagiana*, a new species of ballistospore-forming yeast isolated from *Abies firma* collected in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 33-39.
- Nakase, T., Itoh, M., Takematsu, A., Mikata, K., Banno, I. and Yamada, Y. 1991. *Kockovaella*, a new ballistospore-forming anamorphic yeast genus. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37: 175-197.
- Nakase, T., Okada, G., Sugiyama, J. Itoh, M. and Suzuki, M. 1989. *Ballistosporomyces*, a new ballistospore-forming anamorphic yeast genus. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35: 289-309.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1985. Ballistospore-forming yeasts found on the surface of the Japanese rice plant, *Oryza sativa* L. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 457-474.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1986a. *Bullera dextii* sp. nov. and *Bullera pseudoalba* sp. nov. isolated from dead leaves of *Oryza sativa* and *Miscanthus sinensis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32: 125-135.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1986b. *Bullera intermedia* sp. nov. and *Sporobolomyces oryzicola* sp. nov. isolated from dead leaves of *Oryza sativa*. *J. Gen. Appl.*

- Microbiol. 32: 149-155.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1986c. *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp. in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 32: 225-240.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1986d. The ubiquinone system in strains of species in the ballistospore-forming yeast genera *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* and *Bullera*. J. Gen. Appl. Microbiol. 32: 251-258.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1987a. Studies on ballistospore-forming yeasts from the dead leaves of *Miscanthus sinensis* with descriptions of the new species *Sporobolomyces miscanthi*, *Sporobolomyces subroseus*, and *Sporobolomyces weijmanii*. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 177-196.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1987b. *Bullera variabilis*, a new species of yeast with uniquely-shaped ballistospores isolated from various plant materials. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 343-354.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1987c. *Sporobolomyces naganoensis*, a new species of ballistosporous yeast equipped with ubiquinone-9, isolated from a dead leaf of *Sasa* sp. in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 28: 1-8.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1987d. *Sporobolomyces griseoflavus* and *Sporobolomyces sasicola*, two new species of ballistosporous yeasts isolated from dead leaves of *Sasa* sp. in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 167-175.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1987e. *Sporobolomyces inositolophilus*, a new species of ballistosporous yeast isolated from a dead leaf of *Sasa* sp. in Japan. Antonie van Leeuwenhoek 53: 245-251.
- Nakase, T., Suzuki, M. and Itoh, M. 1987b. *Sporobolomyces yamatoanus*, a new species of ballistosporous yeasts equipped with ubiquinone-9 isolated from dead leaves of various plants in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 445-454.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1988. *Sporobolomyces yuccicola*, a new species of ballistosporous yeast equipped with ubiquinone-9. Antonie van Leeuwenhoek 54: 47-55.
- Nakase, T., Takashima, M. and Hamamoto, M. 1994. *Sporobolomyces linderiae*, a new ballistosporous anamorphic yeast found on a dead leaf of *Lindera obtusiloba* collected at Mt. Fuji. J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 95-101.
- Nakase, T. and Takematsu, A. 1992. *Udeniomyces*, a new ballistosporous anamorphic yeast genus in the *Cryptococcaceae* proposed for three *Bullera* species which produce large bilaterally symmetrical ballistospores. FEMS Microbiol. Lett. 100: 497-502.
- Nakase, T., Takematsu, A. and Yamada, Y., 1993. Molecular approaches to the



- taxonomy of ballistosporous yeasts based on the analysis of the partial nucleotide sequences of 18S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39: 107-134.
- Nishida, H., Blanz, P. A., and Sugiyama, J. 1993. The higher fungus *Protomyces inouyei* has two group I introns in the 18S rRNA gene. *J. Mol. Evol.* 37: 25-28.
- Nishida, H. and Sugiyama, J. 1995. A common group I intron between a plant parasitic fungus and its host. *Mol. Biol. Evol.* 12: 883-886.
- Nyland, G., 1949. Studies on some unusual heterobasidiomycetes from Washington State. *Mycologia* 41: 686-701.
- Nyland, G. 1950. The genus *Tilletiopsis*. *Mycologia* 42: 487-496.
- Oberwinkler, F., Bandoni, R., Blanz, P. and Kisimova-Horovitz, L. 1983. *Cystofilobasidium*: A new genus in the *Filobasidiaceae*. *System. Appl. Microbiol.* 4: 114-122.
- Oliveira, M. C. and Ragan, M. A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11: 195-207.
- Patouillard, N. T. 1900. Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hyménomycètes. Lonsle-Saunier, Paris, France. 184.
- Phaff, H. J. and do Carmo-Sousa, L. 1962. Four new species of yeasts isolated from insect frass in bark of *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sargent. *Antonie van Leeuwenhoek* 28: 193-207.
- Price, C. W., Fuson, G. B. and Phaff, H. J. 1978. Genome comparison in yeast systematics: Delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* 42: 161-193.
- Prillinger, H., Dörfler, C., Laaser, G. and Hasuska, G. 1990. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil III: *Ustilago*-Typ. *Z. Mykol.* 56: 251-278.
- Prillinger, H., Deml, G., Dörfler, C., Laaser, G. and Lockau, W. 1991a. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil II: *Microbotryum*-Typ. *Bot. Acta* 104: 5-17.
- Prillinger, H., Laaser, G., Dörfler, C. and Ziegler, K. 1991b. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil IV: *Dacrymyces*-Typ, *Tremella*-Typ. *Sydowia* 53: 170-218.
- Prillinger, H., Oberwinkler, F., Umile, C., Tlachac, K., Bauer, R., Dörfler, C. and Taufrazhofer, R. 1993. Analysis of cell wall carbohydrate (neutral sugars) from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39: 1-34.

- Ragan, M. A., Bird, C. J., Rice, E. L., and Singh, R. K. 1993. The nuclear 18S ribosomal RNA gene of the red alga *Hildenbrandia rubra* contains a group I intron. *Nucleic Acids Res.* 21: 3898.
- Rohlf, F. J. 1990. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system Ver. 1.60. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York 11733, USA
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sande, C. A. F. M. van der, Kwa, M., Nues, R. W. van, Heerikhuizen, H. van, Raué, H. A. and Planta, R. J. 1990. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *J. Mol. Biol.* 223: 899-910.
- Shivas, R. G. and Rodrigues de Miranda, L. 1983. Two new species of the genus *Sporobolomyces* and a new *Rhodotorula* species from leaf surfaces. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 159-166.
- Sogin, M. L. and Edman, J. C. 1989. A self-splicing intron in the small subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res.* 17: 5349-5359.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Acetobacteria* class nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stadelmann, F. 1975. A new species of the genus *Bullera* Derx. *Antonie van Leeuwenhoek* 41: 575-582.
- Statzell-Tallman, A. and Fell, J. W. 1998. *Sporidiobolus* Nyland. In: The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. ed. by Kurtzman, C. and Fell, J. W., Elsevier, Amsterdam, pp. 693-699.
- Sugita, T. and Nakase, T. Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. (submitted)
- Sugiyama, J. and Goto, S. 1967. Coprophilous fungi from Karakorum. *J. Jap. Bot.* 42: 75-84.
- Sugiyama, J., Fukagawa, M., Chiu, S. and Komagata, K. 1985. Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems and diazotium blue B color test in the genera *Rhodospordium*, *Leucospordium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 519-550.
- Suh, S.-O. and Nakase, T. 1995. Phylogenetic analysis of the ballistosporous anamorphic genera *Udeniomyces* and *Bullera*, and related basidiomycetous yeasts based on 18S rDNA sequences. *Microbiology* 141: 901-906.

- Suh, S.-O. and Sugiyama, J. 1993a. Phylogeny among the basidiomycetous yeasts inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1595-1598.
- Suh, S.-O. and Sugiyama, J. 1993b. Septal pore ultrastructure of *Leucosporidium lariumarini*, a basidiomycetous yeast, and its taxonomic implications. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39: 257-260.
- Suh, S.-O. and Sugiyama, J. 1994. Phylogenetic placement of basidiomycetous yeasts *Kondoa malvinella*, *Rhodospordium dacryoidum*, and the anamorphic yeast *Sympodiomyopsis paphiopedili* by means of 18S rRNA gene sequence analysis. *Mycoscience*, 35: 367-375.
- Suh, S.-O., Hirata, A., Sugiyama, J. and Komagata, K. 1993. Septal ultrastructure of basidiomycetous yeasts and their taxonomic implications with observations on the ultrastructure for *Erythrobasidium hasegawianum* and *Sympodiomyopsis paphiopedili*. *Mycologia* 85: 30-37.
- Suh, S.-O., Takashima, M., Hamamoto, M. and Nakase, T. 1996a. Molecular phylogeny of the ballistoconidium-forming anamorphic yeast genus *Bullera* and related taxa based on small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 501-509.
- Suh, S.-O., Takashima, M. and Nakase, T. 1996b. Phylogenetic study of the anamorphic basidiomycetous yeasts *Rhodotorula lactosa* and *R. minuta*, and related taxa based on 18S ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 1-6.
- Suh, S. O., Takematsu, A., Takashima, M. and Nakase, T. 1996c. Molecular phylogenetic study on stalked conidium-forming yeasts and related basidiomycetous yeast taxa based on 18S rDNA sequences. *Microbiol. Cult. Coll.* 12: 79-86.
- Suzuki, M. and Nakase, T. 1988. The distribution of xylose in the cells of ballistosporous yeasts - Application of high performance liquid chromatography without derivatization to the analysis of xylose in whole cell hydrolysates. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 95-103.
- Swann, E. V. and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: An 18S rDNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.
- Swann, E. V. and Taylor, J. W. 1995. Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: Evidence from the 18S rRNA gene. *Can J. Bot.* 73 (Suppl. 1) S862-S868.
- Talbot, P. H. B. 1965. Studies of 'Pellicularia' and associated genera of hymenomycetes. *Persoonia* 3: 371-406.
- Tablot, P. H. B. 1968. Fossilized pre-Patouillardian taxonomy ? *Taxon* 17: 620-628.
- Takashima, M. and Nakase, T. 1996. A phylogenetic study of the genus *Tilletiopsis*,

- Tilletiaria anomala* and related taxa based on the small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 421-429.
- Takashima, M. and Nakase, T. 1996. A phylogenetic analysis of three group I introns found in the nuclear small subunit ribosomal RNA gene of the ballistoconidiogenous anamorphic yeast-like fungus *Tilletiopsis flava*. *Genes and Genet. Syst.* 72: 205-214.
- Takashima, M. and Nakase, T. 1998. *Bullera penniseticola* sp. nov. and *Kockovaella sacchari* sp. nov., two new yeast species isolated from plants in Thailand, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1025-1030.
- Takashima, M., Suh, S.-O. and Nakase, T. 1995a. Phylogenetic relationships among species of the genus *Bensingtonia* and related taxa based on the small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 131-141.
- Takashima, M., Suh, S.-O. and Nakase, T. 1995b. *Bensingtonia musae* sp. nov. isolated from a dead leaf of *Musa paradisiaca* and its phylogenetic relationship among basidiomycetous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 143-151.
- Takashima, M., Suh, S.-O. and Nakase, T. 1996. Group I introns found in nuclear small subunit ribosomal RNA genes of the ballistoconidiogenous anamorphic yeast *Bensingtonia ciliata* and *Bensingtonia yamatoana*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 189-200.
- Tamaoka, J. and Komagata, K. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Lett.* 25: 125-128.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
- Tsuchiya, T., Fukazawa, Y., Amemiya, S., Yonezawa, M. and Suzuki, K. 1957. Serological classification of the genus *Rhodotorula*. *Yokohama Med. Bull.* 8: 215-224.
- Tsuchiya, T., Fukazawa, Y. and Suzuki, K. 1969. Serological classification of the genus *Sporobolomyces*. *Japan J. Exp. Med.* 39: 101-107.
- Tubaki, K. 1952. Studies on the *Sporobolomycetaceae* in Japan: I. On *Tilletiopsis*. *Nagaoa* 1: 26-31.
- Walt, L. P. van der, Ferreira, N. P. and Richards, P. D. G. 1986. New basidiomycetous yeasts from South Africa I: *Sporobolomyces kluveri-niellii* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 52: 431-436.
- Walt, J. P. van der and Scott, D. B. 1970. *Bullera dendrophila* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 36: 383-387.

- Walt, J. P. van der, Yamada, Y., Ferreira, N. P. and Richards, P. D. G. 1988. New basidiomycetous yeasts from Southern Africa. III. *Sporobolomyces phyllomatis* sp. nov. (*Sporobolomycetaceae*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 471-483.
- Walt, J. P. van der, Yamada, Y., Ferreira, N. P. and Richards, P. D. G. 1989. New basidiomycetous yeasts from South Africa IV. *Sporobolomyces phylladus* sp. nov., characterized by coenzyme Q9 system (*Sporobolomycetaceae*). *Antonie van Leeuwenhoek* 55: 189-195.
- Walt, J. P. van der and Yarrow, D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In *The yeasts, a taxonomic study*, 3rd ed. ed. by Kreger-van Rij, N. J. W., Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 45-105.
- Weijman, A. C. M. and Golubev, V. I. 1987. Carbohydrate patterns and taxonomy of yeasts and yeast-like fungi. *Stud. Mycol.* 30: 361-371.
- Weijman, A. C. M. and Rodrigues de Miranda, L. 1983. Xylose distribution within and taxonomy of the genera *Bullera* and *Sporobolomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 559-562.
- Weijman, A. C. M. and Rodrigues de Miranda, L. 1988a. Carbohydrate patterns of *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54: 535-543.
- Weijman, A. C. M., Rodrigues de Miranda, L. and Walt, J. P. van der. 1988b. Redefinition of *Candida* Berkhout and the consequent emendation of *Cryptococcus* Kützing and *Rhodotorula* Harrison. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54: 545-553.
- Wettstein, R. von, 1885. Untersuchungen über einen neuen pflanzlichen Parasiten des menschlichen Körpers. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Abt I*, 19: 33-59.
- Wilcox, L. W., Lewis, L. A., Fuerst, P. A. and Floyd, G. L. 1992. Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Mol. Biol. Evol.* 9: 1103-1118.
- Wilmotte, A., De Peer, Y. van, Goris, A., Chapelle, S., De Baere, R., Nelisen, B., Neefs, J. -M., Hennebert, G. L. and De Wachter, P. 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 463-444.
- Windisch, S. 1948. *Sporobolomyces holsaticus* n. sp. *Arch. Microbiol.* 14: 287-290.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Yamada, T., Tamura, K., Aimi, T., and Songsri, P. 1994. Self-splicing group I introns in eukaryotic viruses. *Nucleic Acids Res.* 22: 2532-2537.
- Yamada, Y., Nakagawa, Y. and Walt, J. P. van der 1988. *Bensingtonia phylladus*, a new combination for the Q9-equipped species, *Sporobolomyces phylladus*. *Agric. Biol. Chem.* 52: 3203.

- Yamada, Y, Maeda, K. and Mikata, K. 1994. The phylogenetic relationships of *Rhodospodium dactyoidum* Fell, Hunter et Tallman based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: The proposal of *Sakaguchia* gen. nov., a heterobasidiomycetous yeast genus. Biosci. Biotechnol. Biochem 58: 99-103.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 506-511.
- Yamazaki, M., Goto, S. and Komagata, K. 1985. Taxonomic studies of the genus *Tilletiopsis* on physiological properties and electrophoretic comparison of enzymes. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 26: 13-22.

## 付表

Appendix. 1. 18S rDNA sequence data obtained from the databank for constructing the phylogenetic tree

Scientific name	DBJ/EMBL/Gen Bank No.	Scientific name	DBJ/EMBL/Gen Bank No.
<i>Bensingtonia sakaguchii</i>	AB001746	<i>Leucosporidium scottii</i>	X53499
<i>Bullera armeniaca</i>	D78323	<i>Mrakia frigida</i>	D12802
<i>Bullera coprosmaensis</i>	D78326	<i>Neurospora crassa</i>	X04971
<i>Bullera crosea</i>	D31648	<i>Rhodosporidium fulviale</i>	U77395
<i>Bullera dendrophila</i>	D31649	<i>Rhodosporidium toruloideis</i>	D12806
<i>Bullera globispora</i>	D31650	<i>Rhodotorula glutinis</i>	X69853
<i>Bullera hannaie</i>	D78327	<i>Rhodotorula graminis</i>	X83827
<i>Bullera huiaensis</i>	D78331	<i>Rhodotorula lactosa</i>	D45366
<i>Bullera miyagiana</i>	D31651	<i>Rhodotorula minuta</i>	D45367
<i>Bullera mrakii</i>	D78325	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	X84326
<i>Bullera oryzae</i>	D31652	<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	L22260
<i>Bullera pseudoalba</i>	D31660	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J01353
<i>Bullera unica</i>	D78330	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	D13459
<i>Bullera sirensis</i>	D78328	<i>Spongipellies unicolor</i>	M59760
<i>Bullera variabilis</i>	D31654	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	L22261
<i>Bulleromyces albus</i>	X60179	<i>Sporobolomyces roseus</i>	X60181
<i>Caloclea cornea</i>	L22256	<i>Sympodiomycesopsis paphiopedilii</i>	D14006
<i>Candida albicans</i>	X53497	<i>Tanatephorus praticola</i>	M92990
<i>Coprinus cinereus</i>	M92911	<i>Tillatia caries</i>	U00972
<i>Cryptococcus albidus</i>	D31655	<i>Tremella foliacea</i>	L22262
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	D12801	<i>Tremella globospora</i>	U00976
<i>Dacrymyces stillatus</i>	L22258	<i>Tremella moriformis</i>	U00977
<i>Erythrobasidium hasagawianum</i>	D12803	<i>Trichosporon cutaneum</i>	X60182
<i>Fellomyces polyborus</i>	D64117	<i>Tsuchiyaea wingfieldii</i>	D64121
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	D64123	<i>Udeniomyces megalosporus</i>	D31657
<i>Filobasidiella neoformans</i>	D12804	<i>Udeniomyces piricola</i>	D31659
<i>Filobasidium floriforme</i>	D13460	<i>Udeniomyces puniceus</i>	D31658
<i>Heterotextus aplinus</i>	L22259	<i>Ustilago hordei</i>	U00973
<i>Kockovaella thailandica</i>	D64133	<i>Ustilago maydis</i>	X62396
<i>Kondoa malvinella</i>	D13776	<i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	D31656
<i>Kurtzmanomyces nectairei</i>	D64122	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	M94340

Appendix 2. Ballistosticonidium-forming yeasts isolated from leaves in Japan

Species	Source	No. of strains	Frequency <sup>1)</sup>	References
<i>Bensingtonia inermidia</i> *	<i>Oryza sativa</i>	1	NO-157	Nakase and Suzuki, 1987a
	<i>Miscanthus sinensis</i>	1	NB-30	Nakase and Suzuki, 1987a
	<i>Miscanthus sinensis</i>	2	NB-146, NB-151	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Bensingtonia miscanthi</i> *	<i>Sasa</i> sp.	1	NB-186	Nakase and Suzuki, 1987c
<i>Bensingtonia naganoensis</i> *	<i>Miscanthus sinensis</i>	1	NB-150	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Bensingtonia subrosea</i> *	<i>Miscanthus sinensis</i>	2	NB-26, NB-90	Nakase et al., 1987a
<i>Bensingtonia yamatobana</i> *	<i>Sasa</i> sp.	3	NB-173, NB-191, NB-195	Nakase et al., 1987a
	<i>Bensoin obtusilobum</i>	1	NB-212	Nakase et al., 1987a
	<i>Lyonia neziki</i>	1	NB-226	Nakase et al., 1987a
	<i>Rhus tichocarpa</i>	1	NB-245	Nakase et al., 1987a
	<i>Vitis ficifolia</i> var. <i>lobata</i>	1	NB-252	Nakase et al., 1987a
<i>Bullera alba</i>	<i>Oryza sativa</i>	15	NO-1, NO-70, NO-72, NO-77, NO-82, NO-98, NO-105, NO-109, NO-117, NO-141, NO-143, NO-148, NO-150, NO-170, NO-176	Nakase and Suzuki, 1985
	<i>Miscanthus sinensis</i>	3	NB-99, NB-136, NB-162	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Bullera crocea</i>	<i>Oryza sativa</i>	13	NO-7, NO-44, NO-62, NO-81, NO-89, NO-94, NO-110, NO-124, NO-135, NO-147, NO-154, NO-172, NO-177	Nakase and Suzuki, 1985
	<i>Miscanthus sinensis</i>	15	NB-6, NB-48, NB-87, NB-96, NB-100, NB-110, NB-116, NB-120, NB-129, NB-133, NB-138, NB-142, NB-147, NB-149, NB-152	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Bullera miyagiana</i> *	<i>Abies firma</i>	1	Strain 7586-ss-2	Nakase et al., 1990b
<i>Bullera oryzae</i> *	<i>Oryza sativa</i>	1	NO-65	Nakase and Suzuki, 1985
	<i>Miscanthus sinensis</i>	3	NB-111, NB-139, NB-160	Nakase and Suzuki, 1987a
	<i>Sasa</i> sp.	1	NB-171	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Bullera pseudoalba</i> *	<i>Oryza sativa</i>	1	NO-165	Nakase and Suzuki, 1986a
	<i>Miscanthus sinensis</i>	3	NB-29, NB-104, NB-109	Nakase and Suzuki, 1986a
<i>Bullera sinensis</i>	<i>Oryza sativa</i>	2	NO-66, NO-92	Nakase and Suzuki, 1986a
	<i>Miscanthus sinensis</i>	1	NB-126	Nakase and Suzuki, 1986a
<i>Bullera variabilis</i> *	<i>Oryza sativa</i>	3	NO-10, NO-11, NO-43	Nakase and Suzuki, 1987b
	<i>Miscanthus sinensis</i>	5	NB-94, NB-143, NB-145, NB-154, NB-170	Nakase and Suzuki, 1987b
	<i>Sasa</i> sp.	4	NB-190, NB-192, NB-193, NB-194	Nakase and Suzuki, 1987b
	<i>Megantherium biflorum</i> var. <i>dilatatum</i>	1	NB-239	Nakase and Suzuki, 1987b
	<i>Vitis ficifolia</i> var. <i>lobata</i>	1	NB-257	Nakase and Suzuki, 1987b
<i>Sporobolomyces falcatus</i> *	<i>Miscanthus sinensis</i>	1	NB-264	Nakase et al., 1987

(continued)



<i>Sporobolomyces griseoflavus</i> *	Sasa sp.	2	NB-176, NB-178	0.87%	Nakase and Suzuki, 1987d
<i>Sporobolomyces nostriophilus</i> *	Sasa sp.	1	NB-172	0.44%	Nakase and Suzuki, 1987e
<i>Sporobolomyces lactophilus</i> *	Aloes firma	4	Strain 7586-ss-1, 7586-ss-8, 7586-ss-3, 7586-ss-4	1.75%	Nakase et al., 1990a
<i>Sporobolomyces linderae</i> *	Lindera obtusiloba	1	NB-214	0.44%	Nakase et al., 1994
<i>Sporobolomyces aryzicola</i> *	Oryza sativa	1	NO-12	0.44%	Nakase and Suzuki, 1986b
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Oryza sativa	35	NO-3, NO-4, NO-5, NO-8, NO-16, NO-22, NO-28, NO-26, NO-29, NO-31, NO-45, NO-46, NO-47, NO-51, NO-57, NO-64, NO-68, NO-71, NO-74, NO-80, NO-91, NO-95, NO-98, NO-100, NO-106, NO-107, NO-113, NO-118, NO-128, NO-145, NO-151, NO-159, NO-163, NO-166, NO-171	15.28%	Nakase and Suzuki, 1985
	<i>Miscanthus sinensis</i>	37	NB-2, NB-8, NB-12, NB-18, NB-20, NB-22, NB-24, NB-28, NB-31, NB-36, NB-40, NB-42, NB-44, NB-52, NB-57, NB-60, NB-66, NB-102, NB-105, NB-108, NB-116, NB-118, NB-121, NB-123, NB-129, NB-124, NB-127, NB-128, NB-132, NB-137, NB-141, NB-155, NB-161, NB-164, NB-166, NB-167	16.16%	Nakase and Suzuki, 1987a
	<i>Vitis ficifolia</i> var. <i>lobata</i>	1	NB-258	0.44%	Nakase et al., 1989
<i>Sporobolomyces ruber</i> *		2	NB-83, NB-125	0.87%	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	<i>Miscanthus sinensis</i>	1	NB-189	0.44%	Nakase and Suzuki, 1987d
<i>Sporobolomyces sasicola</i> *	Sasa sp.	4	NO-83, NO-74, NO-149, NO-174	1.75%	Nakase and Suzuki, 1985
<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	<i>Oryza sativa</i>	2	NB-86, NB-106	0.87%	Nakase and Suzuki, 1987a
<i>Sporobolomyces subrunneus</i> *	<i>Oryza sativa</i>	1	NO-14	0.44%	Nakase and Suzuki, 1985
<i>Sporobolomyces xanthus</i> *	<i>Acar rutinosus</i>	1	NB-206	0.44%	Nakase et al., 1989
<i>Tilletiopsis lilacina</i>	<i>Oryza sativa</i>	3	NO-2, NO-42, NO-69	1.31%	Nakase and Suzuki, 1985
	<i>Miscanthus sinensis</i>	3	NB-144, NB-148, NB-153	1.31%	Nakase and Suzuki, 1985
<i>Lateniomyces megalesporus</i> *	<i>Oryza sativa</i>	16	NO-6, NO-20, NO-59, NO-67, NO-79, NO-93, NO-97, NO-102, NO-104, NO-111, NO-112, NO-116, NO-120, NO-121, NO-123, NO-168	6.99%	Nakase and Suzuki, 1987a
	<i>Miscanthus sinensis</i>	18	NB-1, NB-5, NB-7, NB-9, NB-27, NB-59, NB-43, NB-46, NB-85, NB-92, NB-97, NB-103, NB-107, NB-117, NB-121, NB-150, NB-155, NB-163	7.86%	Nakase and Suzuki, 1986c
	<i>Sasa sp.</i>	1	NB-79	0.44%	Nakase and Suzuki, 1986c
<i>Lateniomyces pifolia</i>	<i>Miscanthus sinensis</i>	3	NB-155, NB-157, NB-165	1.51%	Nakase and Suzuki, 1986c
	<i>Oryza sativa</i>	3	NO-9, NO-13, NO-108	1.31%	Nakase and Suzuki, 1985
Total		229		100%	

\* reported as new species.

† Frequency = No. of isolates / Total isolates.

Appendix 3. Ballistoconidium-forming yeasts isolated from leaves in New Zealand

Species	No. of isolates	Frequency <sup>a</sup>
<i>Bensingtonia ingoldii</i> *	1 NZ-3	1.05%
<i>Bensingtonia naganensis</i>	1 NZ-115	1.05%
<i>Bullera alba</i>	11 NZ-11, NZ-12, NZ-18, NZ-67, NZ-75, NZ-86, NZ-98, NZ-99, NZ-118, NZ-120, NZ-124	11.58%
<i>Bullera coprosmaensis</i> *	1 NZ-51	1.05%
<i>Bullera crocea</i>	6 NZ-48, NZ-49, NZ-55, NZ-71, NZ-115, NZ-123	6.32%
<i>Bullera hannaiae</i> *	1 NZ-69	1.05%
<i>Bullera huiaensis</i> *	1 NZ-16	1.05%
<i>Bullera mirabilis</i> *	3 NZ-44, NZ-64, NZ-87	3.16%
<i>Bullera unica</i> *	1 NZ-7	1.05%
<i>Bullera variabilis</i>	4 NZ-19, NZ-23, NZ-92, NZ-96	4.21%
<i>Sporobolomyces coprosmae</i> *	1 NZ-47	1.05%
<i>Sporobolomyces coprosmicola</i> *	2 NZ-57, NZ-58	2.11%
<i>Sporobolomyces dirimmae</i> *	5 NZ-68, NZ-78, NZ-79, NZ-82, NZ-111	5.26%
<i>Sporobolomyces dracophilus</i> *	1 NZ-105	1.05%
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	1 NZ-46	1.05%
<i>Sporobolomyces inosiphilus</i>	1 NZ-28	1.05%
<i>Sporobolomyces novaezealandicus</i> *	6 NZ-41, NZ-56, NZ-59, NZ-60, NZ-91, NZ-97	6.32%
<i>Sporobolomyces roseus</i>	13 NZ-9, NZ-25, NZ-29, NZ-30, NZ-45, NZ-62, NZ-65, NZ-70, NZ-81, NZ-88, NZ-100, NZ-113	13.69%
<i>Sporobolomyces sasicola</i>	1 NZ-35	1.05%
<i>Sporobolomyces shibataanus</i>	3 NZ-8, NZ-13, NZ-21	3.16%
<i>Sporobolomyces taupoensis</i> *	1 NZ-42	1.05%
<i>Udeniomyces pricola</i>	1	1.05%
<i>Tilletopsis</i> sp.	29	30.53%
Total	95	100%

\* reported as new species.

<sup>a</sup> Frequency = No. of Isolates / Total Isolates.

References: Nakase et al. 1989; Hamamoto and Nakase, 1995, 1996.

## 論文の内容の要旨

論文題目 射出胞子形成酵母の系統分類

氏 名 高島 昌子

射出胞子形成酵母は、射出胞子という独特の分生子を形成することによって増殖することが可能な一群の酵母に与えられた呼称である。“The yeasts, a taxonomic study”, 第4版 (Kurtzman and Fell, 1998)には12属60種が報告されている。射出胞子形成酵母は、発見当初、その分生子形成様式の特異性から、独自の分類群を成すと考えられてきた。しかし、リボソーム遺伝子などの塩基配列に基づく系統解析により、単系統ではないことが明らかとなり、また、担子菌類の3つの綱のすべてに他の菌類と混在しながら分布していることも明らかとなった。これは射出胞子形成能の有無は、必ずしも、担子菌類の系統関係を反映していないことを示すものである。しかし、同時に、射出胞子形成酵母を数多く分離し、研究を行うことによって、担子菌全体の系統関係を演繹することが可能であることを示唆している。

現在、担子菌系酵母の属以上の分類は、主に担子器の形などの形態学的特徴と化学分類学的性質を指標として行われている。これらの形質のうち、菌体中のキシロースの有無および菌糸隔壁孔の構造は系統関係と良い一致を示すものの、他については必ずしもそうではないことが明らかとなってきている。このように、担子菌系酵母において高次分類群は、混沌とした状態となっているため、系統関係を反映した新規表現形質の探索が必要である。そこで、担子菌類の多様な種に対して、系統関係に基づく分類体系を構築するために、新たな種を分離し、種多様性を上げると共に、系統関係を反映する新たな表現形質を探索することを目的に本研究を行った(第一章)。

第二章では、これまでに報告されている射出胞子形成酵母の系統学的位置を知るため、18S rDNA および Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の塩基配列を決定し、これに基づく系統関係の推定を行った。

射出胞子形成酵母 *Bensingtonia* 属および *Tilletiopsis* 属の 18S rDNA 塩基配列を決定し、系統樹を作成した。*Bensingtonia* 属はサビキン綱に位置し、少なくとも2つの系統群から成った。また、*Tilletiopsis* 属はクロボキン綱に位置した。既に報告されている塩基配列と併せ、射出胞子形成酵母全体の系統樹を作成した。射出胞子形成酵母は担子菌類の3つの綱の全てに位置し、特に、サビキン綱ではどのサブクラスターにも位置した。クロボキン綱および菌蕈綱では、射出胞子形成酵母が報告されていないサブクラスターもあった。18S rDNA 塩基配列の遺伝距離から、これらサブクラスターはそれぞれ、目あるいは亜目に相当すると推定された。

*Bensingtonia ciliata*、*B. yamatoana*、*Tilletiopsis flava* の 18S rDNA には group I intron の挿入があった。挿入位置は、*B. ciliata* および *B. yamatoana* は 943 と 1506、*Tilletiopsis flava* は 516、1199 および 1506 であった。943 および 1506 に挿入されていた group I intron はサブグループ IC1、また、516 および 1199 の group I intron はサブグループ IB3 に属した。Group I intron の保存領域の塩基配列に基づき、これらの系統関係を調べたところ、サブグループ IB3 と IC1 は系統的に異なっていた。また、同じサブグループの中では、エクソン部分が系統的に近く、かつ挿入位置が同じものは、それぞれ近縁であった。しかし、*B. ciliata* 1506 (*B. ciliata*, position 1506) のように、離れた系統の種と同じ挿入位置のものと類縁性を示すものもあった。

*Sporobolomyces* 属酵母の基準株 20 株の ITS 領域の塩基配列を決定し、近縁と推定される菌株間の配列を比較したところ、ITS1 の方が、ITS2 よりも進化速度が速いことが推定された。18S rDNA 塩基配列間の遺伝距離が 0.01K<sub>nuc</sub> 以下の時は ITS1 によるグルーピングが可能であり、また 0.03K<sub>nuc</sub> 以下の菌株間の系統を比較する場合には ITS2 が有効であると推察された。

第三章では、担子菌系酵母の系統を反映する新たな表現形質の探索の一つとして、細胞壁糖組成を取り上げた。現在、担子菌系酵母の分類では、菌体中のキシロースの有無が分類指標として用いられている。しかし、担子菌類の3つの綱の内、クロボキン綱およびサビキン綱は菌体中にキシロースを含まず、この点では両綱は区別できない。そこで、Prillinger らによって報告されている細胞壁糖組成に着目し、主に、クロボキン綱およびサビキン綱に位置する酵母の細胞壁糖組成の分析を行い、系統関係と併せて考察を行った。クロボキン綱の種はグルコースが主要構成糖で、少量のマンノースおよびガラクトースを含んでいた。一方、サビキン綱ではマンノースが主要構成糖で、グルコースを含み、また、大部分の株がガラクトースおよびフコースを含んでいた。この結果から、クロボキン綱とサビキン綱は主要構成糖によって区別されることを確認した。

次に、サビキン綱内のサブクラスターと細胞壁糖組成の関係を調べた。供試株

44株の内、11株は細胞壁にフコースを含んでいなかった。これらは、18S rDNAなどに基づく系統関係から同一のサブクラスター(2c)に位置していた。一方、フコースを含む菌株は他の2つのサブクラスター(2aおよび2b)に位置していた。Tsuchiyaらの*Sporobolomyces*属および*Rhodotorula*属の血清学的性状に基づくグルーピングもこの結果を支持するものであった。本結果から、サブクラスター2cは細胞壁にフコースを含まないという特徴を持つと推定された。以上の結果から、担子菌類は細胞壁糖組成に基づき、まず、主要構成糖がグルコースあるいはマンノースによって2つの大別され、さらに、キシロースの有無、またはフコースの有無によってそれぞれ2つずつに細分されると推察された。

第四章では、これらの結果をふまえて、熱帯であるタイの植物から分離した射出胞子形成酵母の系統分類を行った。これまでの射出胞子形成酵母の研究は、温帯地域から分離されたものの報告が多いが、熱帯の植物は温帯とは異なった多様性を示しており、そこに棲息する射出胞子形成酵母も、温帯域のものとは異なった種多様性を示すであろうと推定されるからである。

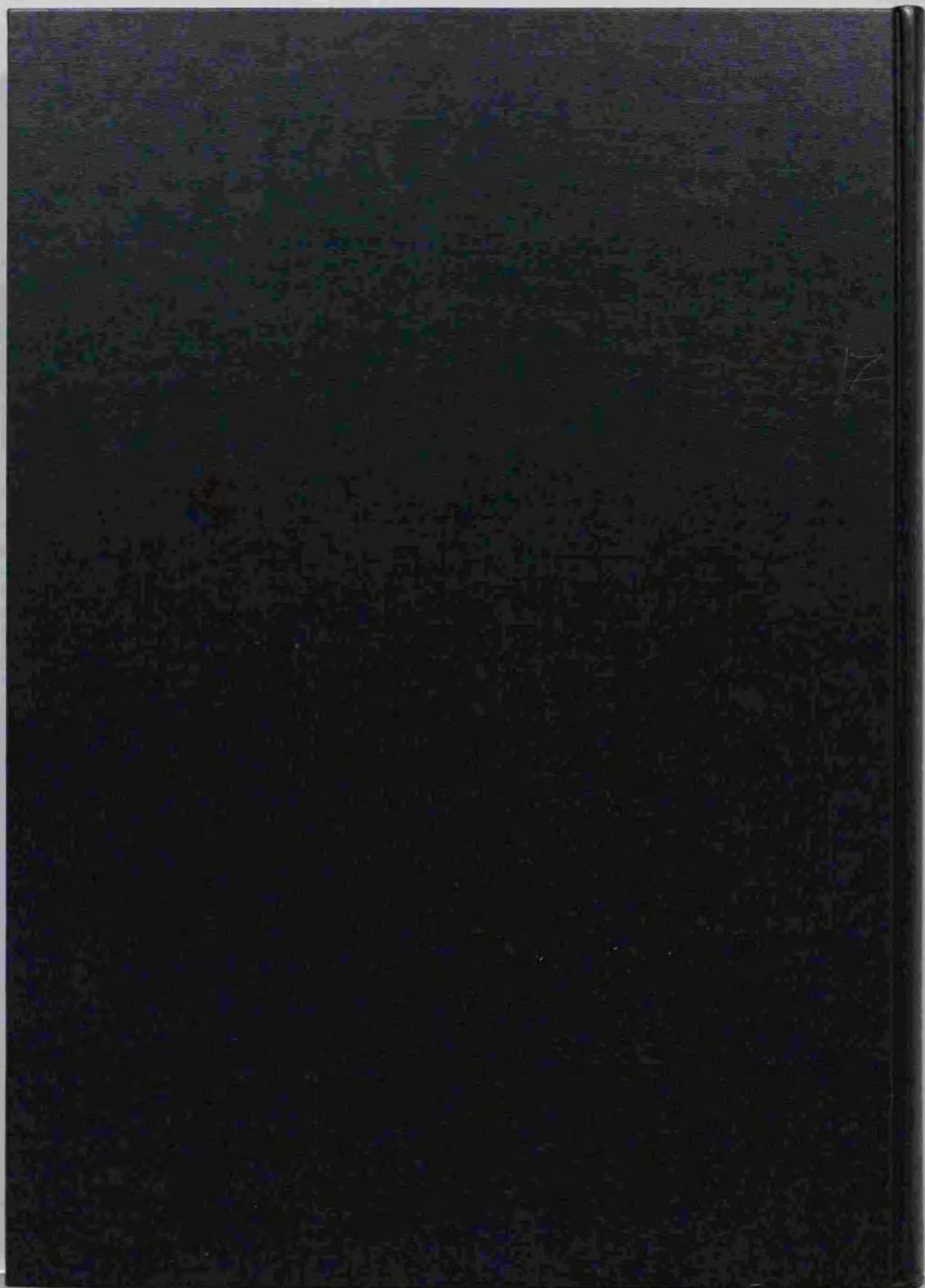
1987年および1990年に、タイ国バンコク近郊の植物の葉から分離した射出胞子形成酵母の系統分類学的研究を行った。1987年分離の63株は17グループに分けられ、このうち7グループは既知の種と、また、1990年分離の73株は13グループに分けられ、このうち6グループは既知の種と同定された。同定できなかったグループの内、2グループ3株については、既に*Kockovaella thailandica* および*K. imperatae*として報告されている。残り13グループ28株についてさらに研究を行った結果、*Bensingtonia musae*、*Bullera penniseticola*、*Kockovaella sacchari*、*Sporobolomyces blumeae*、*S. nylandii*、*S. poonsookiae*、*S. vermiculatus*、*Tilletiopsis dextii* および *T. penniseti* の9新種が明らかとなった。

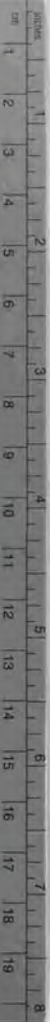
タイの植物から分離した射出胞子形成酵母の分布について、日本各地およびニュージーランドの場合と比較を行った。日本各地、およびニュージーランドの植物からは*Bullera alba*、*B. crocea* および *Sporobolomyces roseus* が多く分離されていた。これらの中、タイの植物からは*B. alba* は1株のみ分離され、また*S. roseus* は分離されなかった。一方、タイの植物から多く分離された *Sporidiobolus ruineniae* は日本、およびニュージーランドの植物からは分離されなかった。日本、ニュージーランドおよびタイの植物から分離した射出胞子形成酵母を系統学的側面から比較すると、各国に固有の系統枝は存在しなかったものの、系統的に近縁な菌群は、温度域の類似したものが多いことが示唆された。従って、生物的多様性を考察する上で、棲息環境の温度は重要な要因であると推察され、別の温度域を探索すれば、さらに新たな系統が発見されると予測される。

第五章では、本研究で行った、18S rDNA および ITS 塩基配列データ、および細胞壁糖組成が、担子菌系酵母の系統分類に極めて有用であることを述べた。さらに、

これらのデータの充実は、系統分類学においてのみならず、各分野において重要な菌類の迅速な同定および分類のためにも必須であると思われる。

本研究は、混沌とした担子菌系酵母の高次分類群に対して、多様な種に対応する系統分類を行うため、新たな種を分離し、酵母の多様性を広げる一方で、これらの種の系統を反映する新たな表現形質の探索を行ったものである。特に、細胞壁糖組成は分類学的にも系統学的にも重要な形質であることが示された。本研究によって得られた結果は、担子菌類の新たな分類体系の構築のために、極めて有用なものであると考える。





### Kodak Color Control Patches

Blue      Cyan      Green      Yellow      Red      Magenta      White      3/Color      Black



### Kodak Gray Scale

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak

