

日本微生物生態学会 第33回大会

JSME 2019

講演要旨集

会期 2019 年9月10 日（火）～13 日（金）

会場 山梨大学 甲府キャンパス （山梨県甲府市武田4-4-37）

目次

シンポジウム	1
口頭発表	
特別セッション	13
一般口頭発表 (9/11 01-1-27)	18
一般口頭発表 (9/12 02-1-27)	31
ポスター発表	
ポスター発表 (9/11 P1-01-79)	46
ポスター発表 (9/12 P2-01-80)	85
高校生ポスター発表	126

SP-1

植物組織に棲む微生物群集の構造・機能を解析する： 植物微生物“ならでは”の課題と研究例

○原 新太郎

東北大・院生命

E-mail: s.hara@m.tohoku.ac.jp

植物組織に棲息する微生物群集は宿主植物の形質に様々な影響を与えると考えられており、その多様性や機能性の解明は重要な課題である。近年、DNA バーコーディングによる微生物叢の解析が比較的容易に行えるようになったが、今後さらなる知見を得るためには植物微生物の解析“ならでは”の課題や注目すべき点がある。

植物組織の内外に棲息する微生物を網羅的に解析するために植物組織からDNAを抽出すると、抽出液中に植物DNAが多量に混入し微生物解析の妨げとなる。細菌の16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンスにおいては、特殊なプローブで植物オルガネラ配列の増幅を抑制する方法が開発され、解析が可能になった¹。しかし、ショットガンシーケンスによるメタゲノム解析にこの方法は適応できない。そこで、演者らの研究グループではBacterial cell enrichment法²を用いて植物組織から細菌細胞を回収し、植物成分を取り除いて各種解析を行っている。本発表では、圃場で栽培したイネ科植物ソルガム根の窒素固定細菌の解析例を紹介する。この研究では、ソルガム根から回収した細菌細胞のメタゲノム解析、さらにプロテオーム解析を行い、非根粒タイプの*Bradyrhizobium*属細菌が窒素固定を担うことを明らかにした³。

また、解析対象とする植物の状態について、考えなければならぬ点がある。これまで、施肥や植物遺伝型の異なる条件で微生物叢を比較する様々な試験が行われてきた。しかし、圃場サンプル、特に植物地上部を対象とした場合、どの組織（葉や茎など）を解析するのか、どの生育ステージを解析するのか、などの基本的な条件が研究者間で統一されていないのが現状である。演者らが圃場栽培ダイズの地上部細菌叢を経時的に調べたところ、窒素固定が活性化する開花期をピークに細菌叢が劇的に変化しており、植物の生育ステージが重要な要素であることが示された。各種オーミクス解析で多くの情報を得られるようになった昨今、植物の生理状態を把握しながら研究を行うことがより重要になると考えられる。

¹ Lundberg et al. (2013) *Nat methods*. 10, 999 – 1002

² Ikeda et al. (2009) *Microb. Ecol.* 58, 703 – 714

³ Hara et al. (2019) *Front. Microbiol.* 10, 407

SP-2

複雑微生物叢を設計・制御する：「コア微生物叢」の組み立て

○東樹 宏和¹

¹京大・生態研, ²JST さきがけ

E-mail: toju.hirokazu.4c@kyoto-u.ac.jp

陸上への進出が始まったごく初期（4億6000万年前）より、植物は地下部で真菌類と精緻な共生系を構築し、多様化を遂げてきました。地球上で現在生育する植物種の9割は、「菌根菌」と呼ばれる真菌たちの関わりを通じて、リンや窒素の供給を受けていると言われています。その一方で、根圏や葉圏にはまだその機能が知られていない、「内生菌」と呼ばれる細菌や真菌が生息しています。

こうした内生菌の中には、土壌中の有機態窒素を無機化して植物に供給するものや、病虫害抵抗性や環境ストレス耐性を宿主植物に付与するものなど、機能性の高いものが数多く存在することがわかってきました。地球温暖化や新規病害虫の出現によって農業生産が不安定化しつつある中、こうした内生菌をうまく利用して「頑健かつ持続可能な農業」を実現することができるでしょうか。

内生菌の機能は種ごとに異なるため、複数の内生菌を1個体の植物に共生させることで、多様な機能を植物体に付与することができると期待されます。しかし、菌どうしの間にも相性があります。数千・数万の候補菌種から最適な組み合わせを調べる作業事態、大変な労力を必要とするものです。

私たちの研究グループでは、日本列島の内生菌リソースのデータベース化を進めるとともに、ネットワーク科学を応用し、最適な菌の組み合わせを探索する手法を開発しています。そうした解析で見出される「コア微生物叢」を用いることで、野外環境下であっても安定的に植物体内で管理できる共生微生物叢を設計できると期待しています。

本講演では、植物-微生物、および、微生物-微生物関係の複雑な相互作用ネットワークに関するインフォマティクスやデータ解析についてこれまでの到達点についてお話いたします。その上で、「複雑微生物叢の設計と制御」という、科学研究としても最難関クラスの目標に挑むための戦略について、議論したいと思います。

SP-3

Synthetic community (SynCom) を用いた植物 — マイクロバイオータ相互作用の分子生物学的解析

○中野 トーマス亮平

Max Planck Institute for Plant Breeding Research

E-mail: nakano@mpipz.mpg.de

動植物と共存する微生物叢（マイクロバイオータ）は宿主の生育や免疫機構，ストレス応答などに大きな影響を与える。次世代シーケンサの発達等により，様々な植物種や環境条件における細菌・真菌・卵菌マイクロバイオータの構造が過去 10 年ほどで次々に調べられ，そのコミュニティ構築における生態学的・農業的要因の影響や宿主生理との相関が多く記述されてきた。その一方で，その相互作用を実際に担う分子機構は未だほとんど明らかになっていない。近年，複数のグループがモデル植物シロイヌナズナやイネを含む多様な植物種から多くの微生物を単離培養することに成功し，それら単離微生物を用いて微生物コミュニティを再構築することが可能となった。この合成コミュニティ（Synthetic community, SynCom）を用いることで再現性良く多様な条件下で実験的に相互作用を解析することが可能になり，個々の微生物のゲノム情報と併せて，植物—マイクロバイオータ相互作用を分子生物学的に解析する技術基盤が整ってきたといえる。すでに多くの研究成果が報告されており，発表者らのグループでも特に宿主免疫機構に着目した研究を推進している。本発表では，植物由来の純粋培養微生物群（カルチャーコレクション）や SynCom を用いた解析成果の実例を挙げながら，今後植物—マイクロバイオータ相互作用の解析が向かうべき道筋の一例を提案したい。

SP-4

植物のマーカー遺伝子群の可視化技術を活用した有用植物共生微生物の機能解析 および高効率スクリーニング法の開発

○清水 将文¹, 別役 重之²

¹岐阜大・応用生物, ²筑波大・生命環境

E-mail: shimizma@gifu-u.ac.jp

持続的農業を推進する国際的な潮流を背景に、海外では有用植物微生物の資材化が猛烈な勢いで進められている。微生物資材の開発は、収集した微生物株の中から有用効果をもつ菌株をスクリーニングするところから始まる。この段階で優秀な有用菌株を如何に効率的に選抜するかが微生物資材開発の成否を決める重要なポイントになることは言うまでもないが、なかなか簡単ではない。特に、植物成長促進作用や免疫活性化を介した病害抑制作用は植物体への接種試験でしか評価できない上に、バイオマスの増加や発病レベルの低下といった効果を確認するまでに一定の時間を要するため、それらの作用をもつ菌株の効率的選抜は非常に難しい。我われは、ホルモン応答やストレス応答に関わるマーカー遺伝子群の可視化技術をスクリーニングに活用できないかと考えている。有用菌株を接種した植物体における各種遺伝子群の発現様式の時空間的解析で得られる知見を基に、ハイスループットスクリーニング法の確立を目指したい。また、そのようにして得られた有用菌株自身を可視化して、植物側のマーカー遺伝子と組み合わせることで、有用菌株が植物体のどのような組織に局在し、局所的もしくはシステムックにどのような影響を及ぼすかの詳細な解析も可能となると考えている。

SP-5

微生物叢データ解析の新展開：代替安定性の地図化とその応用可能性

○鈴木 健大

理研BRC

E-mail: kenta.suzuki.zk@riken.jp

代替安定性とは生物群集が同一の環境条件において複数の安定的な共存状態（安定状態）を示す現象である。例えば、生息場所への種の加入順の違いが、最終的な群集組成を変えることが古くから知られている。代替安定性はしばしば、群集組成の環境依存性と混同される。確かに、緩やかな環境勾配に対して群集組成が劇的に変わることがある。しかし、群集組成の違いが環境条件で説明できる場合、環境条件を固定すれば群集組成は同じになると期待される。この点が代替安定性とは異なっている。こうした違いはあるものの、両者は対立する概念ではない。ある環境条件での複数の安定状態の存在や関係性が、環境勾配に沿って変化する、というように、環境勾配に沿った代替安定性の変化が起こりうる。群集組成の違いは生物群集の生態系機能・サービスの違いにつながる可能性があるため、代替安定性を理解することは重要である。

生物群集の安定状態の捉え方として、例えば複数サンプルの群集組成を2～3次元の空間内にプロットし、その中から点の集合（クラスター）をみつけるアプローチがある。群集組成と環境条件の対応関係を機械学習や統計解析の手法で推定することも難しくない。しかし、こうしたアプローチからは、群集形成プロセスの動的な側面を直接捉えることはできない。また、要素数が少ない系については、時系列データを利用して機構的モデルを構築することが比較的容易になっている。このようなモデルは群集形成の動的な側面の理解に大きく貢献できるだろう。しかし、要素数が多く、かつ代替安定性を示すような系では、パラメータ推定に必要な時系列を取得することが困難であり、十分な時系列があったとしても正確なモデル推定は依然として難しい。

本研究では、多数のサンプルから得られた群集組成データを利用して、安定状態の数、安定状態の群集組成、安定状態同士の関係性などを推定できる手法を紹介する。この手法から、生物群集が示す代替安定性を地図化することができる。このような「地図」から、どのような加入順が特定の安定状態に至るか、安定状態同士はどのような遷移のプロセスで結びついているかなどを把握できる。更に、環境勾配に沿って代替安定性がどのように変化するかを推定することもできる。このアプローチを微生物叢研究に適用するために考慮すべき点や、植物微生物共生系への示唆、応用の可能性について検討したい。

SP-6

日本らしい植物微生物学

○市橋 泰範

理研BRC

E-mail: yasunori.ichihashi@riken.jp

人類は様々な農業に関する取り組みにより人口増加を支える食糧供給を大幅に改善しつつある一方、農地への過剰な施肥により農業由来窒素による環境汚染や土壌の劣化など、大量生産・大量消費・大量廃棄型社会の弊害が指摘されています。加えてリン鉱石の枯渇傾向等が指摘されているため、安心・安全の食料生産を維持した上で農地への適正な施肥を実現する持続可能な循環型農業が求められています。植物の根圏は、地球上で最も微生物が豊富な生態系であり、菌根菌などの多様な植物種と共生して土壌中の養分を根に供給する有用な微生物が存在することが知られております。私たちは、植物と微生物の共生関係の理解が進めば、地球規模での持続可能な食料供給や環境負荷軽減への大きな貢献が期待できると考えております。本発表では、2018年度に発足した新チーム「植物－微生物共生研究開発チーム」で進める、植物と微生物の共生現象の実態解明と産業利用を目指した研究を紹介します。人類に欠かせない食。日本の科学者として、日本農業の匠の技を活用し、質の高い食を作り出し、人類の健康寿命を延ばす日本発イノベーション基盤を作ることを目指します。

SL-1

メタゲノム解析でひも解く淡水湖のファージの多様性と生態

○岡崎 友輔¹, 西村 陽介², 吉田 天士³, 緒方 博之⁴, 中野 伸一⁵

¹産総研・生物プロセス, ²東大・大気海洋研, ³京大・院農, ⁴京大・化研, ⁵京大・生態研

E-mail: y.okazaki@aist.go.jp

海洋や湖沼の水中には1 mLあたり 10^4 - 10^7 細胞もの細菌、さらにその10倍の数の細菌ウイルス(ファージ)粒子が存在し、生態系や物質循環の基盤を成している。本研究では淡水環境におけるファージの多様性および生態をゲノム解像度で培養非依存的かつ網羅的に捉えることを目的とし、琵琶湖をフィールドとしたメタゲノム解析を行った。沖合定点(水深約73 m)において2水深・9か月にわたる時空間的な採水を行い、宿主(細菌)細胞内(0.2-5.0 μ m) および細胞外(<0.2 μ m)の2つのサイズ画分より全DNAを抽出し、シーケンスした。その結果、183系統のファージの完全長ゲノム、および57系統の宿主(細菌)のドラフトゲノムを決定した。そのうち、40系統のファージについて、ゲノム情報から宿主の予測が可能であった。これらの中には淡水環境で普遍的に優占し、生態系・物質循環において中核的機能を担うとされる細菌系統(acI, LD12など)に感染する新規ウイルスも含まれていた。ウイルス群集は表層と深層で大きく異なっており、宿主となる細菌群集の鉛直的分布を反映していることが示唆された。総じて、物理化学的に安定した環境である深層のウイルス群集のほうが経時的に安定していたが、溶原化したファージの誘導や湖の鉛直循環によってウイルス群集組成が大きく変動する時期があることが明らかとなった。多くのウイルスゲノム上に、宿主の生理代謝活性を改変することでウイルスの適応度を高める機能があると考えられている細菌由来の遺伝子(Auxiliary Metabolic Genes; AMGs)が見つかった。特に硫黄同化に関する遺伝子が海洋等の他の環境と比較して多く見付き、硫黄の供給が限られている淡水環境において、ウイルス感染によって発現する遺伝子が硫黄循環における重要な機能を担っていることが示唆された。さらに、海洋や他の淡水環境でこれまでに報告されてきたウイルスメタゲノムとの比較によって、世界中の淡水環境、さらには海洋も含めた水域環境に広く分布するコスモポリタンなウイルスグループを多数特定できた。

SL-2

水圏の嫌気環境における従属栄養性原生生物

— 現存量、多様性、生理・生態 —

○近藤 竜二, 片岡 剛文

福井県大・海洋

E-mail: rykondo@fpu.ac.jp

水圏の底泥や成層期の底層など、嫌気的な環境は普遍的に存在する。嫌気環境での細菌の生態や機能については詳細に調べられているものの、嫌気性の従属栄養性原生生物(鞭毛虫や繊毛虫)についての研究はほとんどない。本講演では、密度成層湖である水月湖と硫化水素が蓄積している湖沼底泥中の嫌気性原生生物の現存量と群集組成について述べるとともに、培養株を用いた生理や嫌気性原生生物の培養法についても若干触れる。底層に多量の硫化水素が蓄積する水月湖の水柱の鞭毛虫の現存量と細菌摂食活性を調べたところ、嫌気環境でも好気環境に生息する鞭毛虫と同等以上の細菌摂食活性を潜在的に有することが明らかとなった。しかしながら、細菌と鞭毛虫の現存量が低いために細菌の回転率に対する鞭毛虫の寄与は小さいと考えられる。水月湖から単離した通性嫌気性の鞭毛虫の増殖生理と細菌捕食活性を、細菌株との二者培養系を用いて好気と嫌気の条件で調べた。嫌気条件下での最大比増殖速度と最大細菌摂食速度は、好気条件に比べて、それぞれ1/7、1/3程度でしかなかった。細菌摂食速度の半飽和定数は好気と嫌気で差はなかったが、水月湖水中の全菌数から考えると、この鞭毛虫は、現場環境では餌密度に制限されていると考えられた。一方、福井県の三方五湖と琵琶湖南湖の底泥表層中の鞭毛虫の現存量を調べたところ、その現存量は、湖によって異なるものの、底泥直上水の数十倍から数百倍で、嫌気的な環境でも高密度で原生生物が存在することが明らかとなった。同じ底泥試料から抽出したDNAを鋳型として18S rDNAのV4-V5領域をPCR増幅し、NGSにより、原生生物の群集組成を調べた。その結果、嫌気的な底泥中にも極めて多様な原生生物が存在し、塩分環境の異なる湖間では、その群集組成が異なることが明らかとなった。また、未同定の配列の他、既存のどの分類群にも当てはまらないものも多くみられ、未知の原生生物の存在も示唆された。泥粒子が妨害するために底泥中の原生生物による細菌摂食活性の測定は困難なため、現在、底泥から原生生物を単離してその生理を調べることによって生態の解明を目指している。嫌気性細菌の培養技術を応用して、これまでに数株の原生生物の培養に成功しており、いくつかの培養株については18S rDNAの塩基配列を決定して系統解析を行ったところ、新種の原生生物である可能性が示された。

SL-3

陸域だけじゃない、水域でも重要な真菌類の多様性と機能

○鏡味 麻衣子

横浜国大・環境情報

E-mail: kagami-maiko-bd@ynu.ac.jp

生態系の物質循環を理解する上で、細菌・古細菌に加え真核微生物の機能解明は欠かせない。真核微生物のなかでも真菌類は、系統的にも多様で、陸域生態系においては分解者や共生者、寄生者として重要な機能を担っていることがわかっている。陸域と異なり、海洋や湖などの水域生態系において真菌類はほとんど存在しないと考えられてきた。しかし、次世代シーケンサーが汎用化され、メタバーコーディング研究が進んだ結果、湖沼や海洋においても多様な真菌類が存在することが明らかになった。ただし検出される水生菌類のほとんどは正体不明であり、Dark Matter Fungi(DMF)と称されている。DMFの多くはDNAデータベース登録数の圧倒的に少ないツボカビなど下等菌類である可能性が高い。実際、我々は顕微鏡観察とDNA解析を組み合わせる(Single spore PCR法)ことで、湖におけるDMFの正体はツボカビやロゼラ菌、アフエリダなど鞭毛をもつ下等菌類で、植物プランクトンに寄生する系統であることを明らかにした。これら鞭毛菌類は真菌類の最も祖先的な系統であり、菌類の進化を考える上でも重要である。現在、ゲノム解析を進めている。

真菌類が水域の物質循環において重要な機能を担うことも見えてきた。ツボカビは植物プランクトンや花粉などの有機物を消費し遊走子を水中に放出するが、その遊走子はミジンコなど動物プランクトンの重要な餌である。このツボカビを介した物質流はMycoloopと称され、食物網の構造や安定性に影響を与えている。またツボカビとバクテリアは有機物をめぐり競争関係にあり、ツボカビがバクテリアの量や種組成に影響をあたえ、ひいては溶存有機物DOMの質を改変していることも明らかになった。

湖沼だけでなく海洋や河川、雪氷、都市環境からも新奇の水生菌類が続々と検出されている。例えば、北極や沿岸海洋では珪藻に寄生するツボカビが検出され、藻類大量培養系や下水処理場、道路の側溝ではロゼラ菌やアフエリダ菌などが報告されている。Marine snow(凝集体)に菌類が多数付着している様子も観察された。これら菌類は地球レベルでの物質循環に影響を与えている可能性が高い。

参考文献

Grossart et al. (2019) Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 17, 339-354.

Amend et al. (2019) Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *mBio* 10, e01189-18.

SL-4

淡水産微小甲殻類の多様性と生態

○牧野 渡

東北大・院生命

E-mail: wataru.makino.e8@tohoku.ac.jp

本発表での淡水産微小甲殻類とは、ミジンコやケンミジンコと総称される生物群(タクサ)を示す。これらのタクサは、会員諸賢が思い浮かべる「微生物」よりも、はるかに大型であるため、その分類についても、はるか昔に整理済みだと思われるかもしれない。ところが近年、従来よりも微細な形態形質が重用され始めたことと、DNAバーコーディングなどの分子生態的手法が用いられ始めた結果、従来は同種とされていたタクサが、複数種に細分化される事例が頻発している。すなわち淡水産微小甲殻類の多様性は、従来の理解よりもはるかに高そうであると、繰り返し指摘されているのが現状である。本発表では、現在進行中の、日本淡水産微小甲殻類から網羅的にDNAバーコードを取得する試みと、現在までに得られた結果について紹介する。例えば、ヒトの生存と生業には水が必須であるため、ヒトは淡水生態系に対して多大な影響を与えてきた。日本では国土面積の5パーセント程度が水田へと改変され、それを涵養するため池も20万個以上も作られてきた。そして水田では毎年(ほぼ)決まった時期に水が入り、決まった時期に水が干上がるというサイクルが繰り返されている。このような人為改変が、淡水産微小甲殻類に与える影響についても、網羅的DNAバーコーディングの結果をもとに考えてみたい。

SL-5

淡水生態系における好氣的メタン生成プロセス

○岩田 智也¹, Khatun Santona¹, 小島 久弥², 福井 学², 寺島 美亜², 高須賀 太一³, 田中 健太⁴, 篠原 隆一郎⁵

¹山梨大・生命, ²北大・低温研, ³北大・農, ⁴筑波大・山岳セ, ⁵国環研

E-mail: tiwata@yamanashi.ac.jp

淡水生態系はメタンの主要な放出源であり、自然起源からのメタン放出量のおよそ12%が湖や河川から大気へ脱ガスしていると考えられている。湖面から放出するメタンは、酸素の枯渇した堆積物中や深水層においてメタン菌が生成した気体であると考えられてきた。しかし、海洋や湖沼の垂表層には過飽和のメタンが存在していることが古くから知られている（メタンのパラドックス）。また、湖では堆積物中で生成したメタンの多くがメタン酸化細菌によって消費されることから、大気へ脱ガスするメタンは主として垂表層に存在するメタン極大に由来している可能性がある。しかし、湖におけるメタンの垂表層極大の成因やメタン生成に関わる微生物についてはよくわかっていない。

我々の研究により、メタンの垂表層極大は水深の深い湖において夏期に出現する傾向があることが明らかとなってきた。この過飽和メタンは大気からの溶解や湖底・河川・沿岸帯からの輸送により形成されたものとは考えにくく、垂表層で生成している可能性が高い。とくに、ホスホン酸分解酵素（C-Pリアーゼ）を有するピコシアノバクテリア（*Synechococcus*）の分布とメタン極大の季節消長が一致することやC-Pリアーゼ活性が現場で確認されていることから、浮遊性微生物のホスホン酸分解でメタンが生成しているものと考えている。夏季の成層期にはホスホン酸代謝によるリン獲得機能を有するピコシアノバクテリアが貧栄養な表層-垂表層で栄養塩を巡る競争に優位となり、それによってメタンが好氣的に生成しているというシナリオを想定している。さらに、我々は新たなホスホン酸分解経路によるメタン生成プロセスも発見した。本講演では、細菌以外の微生物にも注目しながら、湖水の好気環境におけるメタン生成プロセスについて紹介する。

SS-1

シロアリ腸内原生生物と細胞内・表面共生細菌間の相互作用

○雪 真弘, 大熊 盛也

理研BRC

E-mail: masahiro.yuki@riken.jp

共生の教科書的な例として、シロアリ腸内の共生系が挙げられる。シロアリは高等シロアリと下等シロアリに大きく分けられるが、下等シロアリの腸内には、十数種の原生生物、古細菌と数百種の細菌が共生している。これらの微生物種のほとんどは宿主シロアリ種に特異的な系統であり、同一シロアリ種内ではこの複雑な腸内微生物叢は高度に保存されている。さらに原生生物の細胞内、細胞表面にも細菌が共生しており、複雑に相互作用した多重共生系が構築されている。これらの腸内微生物の多くが難培養であるため、培養を介さないメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析により、腸内微生物が木材分解や窒素固定等の共生関係に重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、腸内微生物叢を構成する個々の細菌の役割はほとんどが不明のままであった。我々は、網羅的に腸内共生細菌を1細胞からゲノム解析することにより、複雑な多重共生系の解明を進めている。これまでに100種以上のシロアリ腸内共生細菌種のシングルセルゲノム解析を行っている。本発表では、近縁な原生生物2種の細胞内に共生する細菌の比較シングルセルゲノム解析や原生生物細胞表面に共生する3種の *Treponema* 属細菌の役割分担の例などを紹介し、宿主-共生体の相互作用について議論する。

SS-2

好熱好酸性ナノアーキアの共培養系から探るアーキア間相互作用

○加藤 真悟¹, 小笠原 綾香², 伊藤 隆¹, 酒井 博之¹, 雪 真弘¹, 高品 知典², 大熊 盛也¹

¹理研BRC・JCM, ²東洋大・生命

E-mail: skato@riken.jp

ナノアーキアは、呼び名の通り細胞サイズ（直径500 nm以下）もゲノムサイズ（0.6 Mbp以下）も小さい生物であり、その生理・生態については不明な点が多く残されている。系統学的には、DPANN群の中でもNanoarchaeota門に属するアーキアである。ナノアーキアの培養報告例は、これまでに海底熱水噴出孔から1例、陸上温泉から2例あるのみである。いずれのナノアーキアも嫌気条件下で増殖し、その生育に好熱性クレンアーキアの存在を必要とする絶対寄生性である。

本発表では、好気条件下で増殖する新規の好熱好酸性ナノアーキアを報告する。栃木県奥塩原で採取した温泉水を、改変 *Sulfolobus* 用培地（pH2.5）に植菌し、70℃かつ好気条件下で集積培養した。その集積培養液を元にして、改変MPN法によりナノアーキアの純化を試みた。最終的に、ナノアーキアの一種である *Candidatus* Nanopusillus acidilobi に近縁な配列（相同性85.8%）と、好熱性クレンアーキアの *Metallosphaera sedula* に近縁な配列（100%）のみが16S rRNA 遺伝子解析により検出される共培養系を得た。それぞれを、MJ1株、MJ1HA株と暫定的に呼ぶ。MJ1株-MJ1HA株共培養系およびMJ1HA株純粋培養系において、両株の細胞数の継時変化を定量PCR法により測定した結果、共培養系においてMJ1株の細胞数がMJ1HA株の細胞数の3-6倍程度になると、MJ1HA株の増殖が阻害されることが確認された。MJ1-MJ1HA共培養系からDNAを抽出し、Illumina MiSeqおよびNanopore MinIONを用いてゲノム配列決定を行なった結果、MJ1株の完全ゲノム配列（0.67 Mbp）およびMJ1HA株の完全ゲノム配列（2.28 Mbp）が得られた。MJ1株のゲノムからは、遺伝情報の複製や翻訳、細胞分裂、運動性、酸素耐性に関わる遺伝子が見つかった。その一方で、先行研究例と同様に、アミノ酸や核酸、さらにはATPの合成に関わる遺伝子が欠如していた。各種顕微鏡観察により、MJ1株の細胞がMJ1HA株の細胞に付着している様子も確認できた。以上の結果に基づいて、ナノアーキア-宿主アーキア間の共生様式について議論する。

SS-3

カメムシから紐解く昆虫腸内共生の成立メカニズム

○大林 翼

農研機構・農環研 / フランス・CNRS

E-mail: tsubasa.ohbayashi@i2bc.paris-saclay.fr

昆虫類の多くは微生物と密接に関わりながら生きている。昆虫の共生微生物は、必須アミノ酸・ビタミンの補給やエサの分解に寄与することから、宿主の生存に重要な役割を果たすことが知られている。このような共生微生物の機能的側面の理解が進んでいる一方、内部共生の成立に関わる分子メカニズムは不明な点が多く残っている。その最大の理由は、共生微生物が昆虫の体内環境に高度に適応しているため、単離培養ができず、遺伝子組換え等の実験手法が適用困難な点にある。ダイズの重要害虫であるホソヘリカメムシは消化管の後方に「盲のう」と呼ばれる袋状組織を多数発達させ、その内腔にたった1種類の共生細菌 (*Burkholderia insecticola*) を保持している。昆虫の共生微生物としては例外的に *B. insecticola* は培養可能であり、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系は昆虫内部共生の成立機構を解明する上で良いモデル系といえる。

私たちはまず、カメムシ消化管における食物および細菌の動態に着目し、消化管の組織学的観察を行った。その結果、共生器官の手前にある狭窄部が、餌や雑多な細菌の中から *Burkholderia* 共生細菌のみを通過させる、高度な“細菌選別器官”になっていることを発見した (Ohbayashi *et al.*, 2015 PNAS)。次に、私たちはRNA-seq・Tn-seqを用いて、*B. insecticola* の全遺伝子を網羅的に機能解析することにした。培養時・腸内共生時における *B. insecticola* の遺伝子発現についてRNA-seq解析をおこなったところ、硫酸化合物やアラントインの代謝経路に関わる遺伝子が腸内共生時に高発現していた。硫酸化合物やアラントインは昆虫の老廃物であることから、*B. insecticola* は宿主が排出する老廃物を資化しながら昆虫腸内で増殖していることが示唆された (Ohbayashi *et al.*, 2019 ISMEJ)。さらに現在は、Tn-seq解析による *B. insecticola* の昆虫腸内への定着因子を探索している。Tn-seq解析は、トランスポゾン挿入変異法と次世代シーケンス解析を組み合わせた、ゲノムワイドな遺伝子スクリーニング手法のひとつである。本講演では、*in vivo* Tn-seq解析の最新結果を紹介するとともに、RNA-seq・Tn-seq解析から見えてきた昆虫腸内における *B. insecticola* の定着メカニズムについて議論する。

SS-4

植物病原細菌の植物感染動態と植物の免疫応答

○別役 重之

筑波大・生命/MiCS

E-mail: betsuyaku.shige.ge@u.tsukuba.ac.jp

植物はその周囲に存在する微生物と様々な相互作用をしている。それらのうち、特に植物-病原微生物相互作用に関しては、大きな経済的損失にもつながることからこれまで精力的な研究が行われてきた。その結果、植物側の「免疫」とそれに打ち勝とうとする微生物側の「病原性」の複雑なせめぎ合いが分子レベルで理解されるようになってきた。植物は一般に、微生物種に広く保存された細胞壁や鞭毛などの構成成分を「微生物分子パターン」として認識し、パターン誘導型免疫 (PTI) を発動することでほとんどの微生物に対して免疫効果を発揮していると考えられている。一方、PTI抑制能を有する分子 (「エフェクター」と総称される) を保有する一部の微生物のみが特定の植物の病原体として存在していると考えられている。この病原体に対しても、一部の植物はエフェクターを特異的に認識することでエフェクター誘導型免疫 (ETI) を発動させ、その感染を抑制することができる。このような植物-病原微生物相互作用の分子機構は、植物と微生物との長きに渡る共進化の一つの結果であるとも考えられている。

しかし、このような相互作用の様式が理解できるようになっても、実際の感染の現場で、微生物や植物が、いつ、どこで、どのように、「病原性」や「免疫」を発揮しているのかといったことはほとんど分かっていない。そこで、我々は「病原性」と「免疫」の時空間的側面に着目し、植物-病原微生物相互作用のモデルシステムであるシロイヌナズナ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) 株を用いて、イメージングを基盤とした実験系を立ち上げた。その結果、*Pst* が植物細胞間隙において、内部で機能分化したバイオフィーム (BF) 様構造体を形成すること、また、BF 様構造体の周辺植物細胞で一過的に強い免疫応答が誘導されることを見出した。このような植物-病原微生物相互作用の時空間的動態に関して紹介したい。

S1-1

メタゲノム中のダークマター機能性遺伝子の解析

○吉澤 晋^{1,2,4}, 西村 陽介¹, 岩崎 渉^{1,3,4}

¹東大・大海研, ²東大・院新領域, ³東大・院理, ⁴東大・微生物連携機構

E-mail: yoshizawa@aori.u-tokyo.ac.jp

DNAシーケンス技術の飛躍的な発展は、メタゲノム解析を比較的容易に行える研究環境を整え、多くの微生物研究者がビッグデータを扱う時代を生み出した。膨大な遺伝子情報を含むメタゲノムデータは、そこに住む微生物の種の構成や生理的特徴を描き出す情報基盤として、近年の微生物生態の研究にはなくてはならないものになっている。しかしながら、WETを専門とする研究者がかつて扱っていた情報の数万から数百万倍ものデータが一度に手に入ることから、遺伝子情報の海に溺れかかっている研究者も少なくない。一方で、メタゲノム解析に用いられるデータは膨大ではあるが、扱う情報は機能が推定できる遺伝子のみで、半数近くを占める未知遺伝子はダークマターとして解析対象から外されるのが一般的である。つまり、多くの場合メタゲノムデータの奥深くに隠された生命現象を掘り起こす作業すら行われていないのが現状である。しかしながら、DNAデータが増え続けることが確実な状況において、ダークマター遺伝子の機能解明は難攻不落の微生物生態学を築く上で避けて通れない道だと考えられる。それではどのようにしてダークマター遺伝子の機能解析を行えば良いのか？何の手がかりも無い状態で遺伝子の機能予測をするのはほぼ不可能に近いので、何らかの機能に結びつく情報を得ることが必要不可欠となる。そこで本発表では、膨大なデータが存在するからこそ可能になった、ダークマター遺伝子の機能推定手法の一例を紹介したい。今回対象としたダークマターは、未知の光受容体である。地球上のほぼ全ての生物は太陽光から生態系に流れこむエネルギーを利用して生きていることから明らかなように、クロロフィルやロドプシンなどの光受容体の深い理解は生態学的観点からも重要である。またクロロフィルなどの光受容体が有光層に多く存在することは現場観測から知られていたが、メタゲノム解析からも表層から深層にかけて関連遺伝子が減少することが近年示されている。それでは、既知光受容体と同じように分布するダークマター遺伝子を見出すことができれば、やみくもに探すよりも遙かに効率よく未知の光受容体を選別できるのではないだろうか？本発表では、メタゲノムの配列データと環境プロファイルを利用することで、ダークマター遺伝子の機能が推定可能かについて議論したい。

S1-2

大規模マイクロバイームデータセットの機械学習と微生物群集構造の全体像

○東 光一

遺伝研

E-mail: khigashi@nig.ac.jp

近年、世界中の様々な自然環境から膨大な数のサンプルが取得され、それらの微生物群集構造データが爆発的な勢いで蓄積されている。微生物群集構造を扱う研究の多くは、事前に設計した離散的な環境カテゴリ（河川と海洋、健全と疾患など）を各サンプルに割り当てることで、特定の環境で観察される群集の特徴や、環境間の群集構造の差異を明らかにすることを目的としている。しかしながら、人間が認識する「環境」と微生物が適応し群集構造が最適化される「環境」は必ずしも一致しない。人間の環境分類が粗すぎる（「ヒト腸内」でも異なる複数の群集構造パターンが存在する）場合もあれば、逆に異なる環境で同じ微生物が検出されることもある。さらに実際の環境は明確な境界の定義が難しく、環境カテゴリの設計とカテゴリ間での群集構造比較が必ずしも適切でない場合も多い。そこで本研究では、微生物群集構造情報（系統組成）と由来環境に関する自然言語記述文書が対となった3万以上のサンプルを含む大規模マイクロバイームデータセットに統計的潜在意味解析（トピックモデル）を適用することにより、群集構造を規定する潜在的な「環境」およびそのような環境の連続性を抽出することを試みた。機械学習の結果をもとに、推論されたモデルを可視化して全体を俯瞰するウェブツールLEA（Latent Environment Allocation）を開発した（<http://leamicrobe.jp>）。LEAはすべてのマイクロバイームサンプルを複数の「環境」の混合として表現している。したがってLEA上でどのような環境が接続されているかを見ることで、どのような環境間で連続的な群集構造の変化が見られるかを評価できる。LEAはインタラクティブなウェブアプリケーションとして実装しており、微生物系統名で検索することでその微生物がどのような環境に生息するのかを調べたり、ユーザが新規に取得したメタゲノムサンプルの系統組成データをアップロードすることでそのサンプルがどんな環境に由来するのか、LEA上にマッピングする機能も提供している。LEAは既知の微生物群集構造パターンの全体像を可視化したマップである。メタゲノムデータは現在もさらなる勢いで蓄積し続けており、今後も新たなデータを追加してLEAを拡張していくことで、より詳細なパターンが得られることを期待している。

S1-3

光を使うか、それとも避けるか？

——海洋細菌の二種類の光適応戦略の解明

○熊谷 洋平¹, 吉澤 晋², 木暮 一啓², 岩崎 渉^{2,3}

¹海洋研究開発機構 深海バイオリソース研究グループ, ²東京大学大気海洋研究所, ³東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

E-mail: kumay@jamstec.go.jp

海洋表層に生息する細菌の約半数はプロテオロドプシン（PR）と呼ばれる光受容体を持ちます。PRは「ソーラーパネル」のような役割を持ち、PRを持つ細菌は光のエネルギーを用いてATPを作ることができます。その機能からPRは細菌の海洋表層への適応に大きく貢献していると考えられていますが、そもそもなぜ、そのように重要な光受容体であるPRを持つ細菌と持たない細菌がいるのでしょうか？PRが本当に「持ち得」なタンパク質なら、海洋表層の細菌すべてがPRを持っていてもいいのではないのでしょうか？この疑問に答えるため、私たちは海洋性フラボバクテリアにおいて、PRの有無に着目した大規模な比較ゲノム解析を行い、それらの遺伝子組成の差を統計的に検出しました。結果として、PRを持たない細菌はその多くがAPE/FTPと呼ばれる細胞外膜に局在する色素の合成系遺伝子を持つことがわかりました。APE/FTPは細菌の外膜に局在するUV吸収性の色素で、細菌の「日傘」として働き光防御に用いられることがわかっています。比較に用いた76株に加え、全ての解読された細菌のデータを調べても「ソーラーパネル(PR)」と「日傘(APE/FTP)」の遺伝子を両方持つ株は1株もおらず、光からエネルギーを得る「ソーラーパネル型」と色素で光を遮る「日傘型」の適応戦略にはトレードオフ関係があることが示唆されました。つまり、太陽からの莫大な光エネルギーにさらされる海洋表層の細菌は、ただその恩恵を受けるだけではなく、「光を利用するか、光を避けるか」という"究極の選択"を迫られているということになります。本シンポジウムでは、「ソーラーパネル型」と「日傘型」、それぞれの戦略を取る海洋性フラボバクテリアの生理/生態/進化について、ゲノム解析から得られた結果を発表します。

S1-4

メタゲノムデータを活用した常在細菌叢の時系列解析

○高安 伶奈^{1,2}, 須田 互², 渡辺 栄一郎², 梅山 大地², 黒川 李奈^{2,3}, 服部 正平^{2,3}

¹東大・院医, ²理研・IMS, ³早稲田・院先進理工

E-mail: lena.takayasu@humeco.m.u-tokyo.ac.jp

常在細菌叢は個体に特有である一方で、数時間から数年のタイムスパンでさまざまに変動することが調べられている。たとえば、日常的には唾液や腸内細菌叢において、数時間単位で概日リズムに従った菌叢変動が起きており、たとえば唾液から見る口腔細菌叢では朝と夜で、7~80%もの菌種が変動していることが明らかになっている。また、さまざまな年齢のヒトの腸内細菌叢の比較から、年齢毎の菌叢構造の特徴なども報告されており、無菌マウスの寿命が通常マウスと異なること等からも、長期の腸内細菌叢の変容が様々な機能低下/維持と関連を持つと考えられてきた。本講演では、特にヒトにおける前向き研究が困難である、宿主の一生における腸内細菌叢の時系列変動の実際やその個体の機能低下/維持への関与について、マウスを用いた最新の結果を報告する。我々は、同腹のSPFマウス(B6)9匹について、生後直後から死亡まで、定期的に糞便の採取を行い(平均4.3日に1回サンプリング)、16S解析で細菌叢の変動を詳細に追った。また、マウスは死後解剖を行い、その器官の異常や腫瘍の有無を確認した。9匹のうち、自然死した7匹を寿命の解析に用いた。マウスの平均寿命は922.7 ± 71.6日であり、寿命と若年期(100-500日頃)の α 多様性には正の相関が、老年期(700-900日)の α 多様性には負の相関が見られた。同様の相関は腫瘍の形成においても観察された。また、OTUの時系列ダイナミクスは、大きく8つのタイプに分けることができ、ダイナミクスのパターンや、各細菌種の滞在時間は、系統ごとに大きく異なっていた。一生にわたるサンプル中での各OTUの観察頻度のヒストグラムは二峰性を示し、一生にわたって存在する「ライフコアマイクロバイーム」が、その他の一過性の細菌群とは異なったメカニズムで定着している可能性が示唆された。このような機能低下との相関や細菌群の定着に関する特徴は、他の種にも普遍的に見られる可能性があり、さらなる研究が期待される。また、これらの細菌群の挙動と宿主生理の因果関係についても、今後明らかになっていくだろう。

S1-5

環境細菌叢が持つゲノム修飾機構を明らかにする「メタエピゲノム」解析の提唱と実証

○平岡 聡史

海洋研究開発機構 (JAMSTEC) 生命理工学センター

E-mail: hiraokas@jamstec.go.jp

近年、遺伝子の発現制御や細胞の癌化・分化を制御する機構としてエピジェネティクスが注目を集めており、真核生物を対象としたエピゲノム解析が盛んに行われている。一方で、細菌・古細菌といった原核生物においても、DNAメチル化修飾に代表されるエピジェネティクスが起きており、ファージ感染に対する防衛機構(制限修飾系)や遺伝子転写制御、DNA修復等の生理生態学的に重要な役割を担っていることが知られている。近年に至るまで、さまざまな分離培養株を用いた研究が進められてきており、細菌・古細菌のほぼ全ての系統においてDNAメチル化が普遍的に起きていると考えられている。ところが環境中の原核生物の大半は培養が難しく、またDNAメチル化修飾の実験的観測の煩雑さや制約の為に、未培養系統が優占する環境細菌叢については解析が行われておらず、エピジェネティクスの普遍性や多様性は検証されてこなかった。そこで我々は、環境細菌叢のゲノム情報を非培養ベースで解析するメタゲノム解析と、1分子シーケンシング技術(PacBioシーケンサー)によるDNAメチル化修飾観測技術を組み合わせ、未培養系統が優占する環境細菌叢のエピジェネティクスを観測する新たな手法、「メタエピゲノム解析」を確立し、実際に環境サンプルに対して解析を行ってきた。

本研究では、微生物生態学的な面白さや実験的な制約を考慮し、日本最大の湖である滋賀県の琵琶湖の水圏微生物叢を解析した。表層5mと深層65mの水サンプルを採取し、Circular Consensus Sequencing (CCS)法によるショットガンシーケンスとアセンブリを行った結果、細菌・古細菌のドラフトゲノムを19株分得られ、その大半は未培養系統に由来していた。これらのゲノム中からDNAメチル化修飾の検出を行い、新規のものを含む多様なメチル化モチーフを発見した。さらに各モチーフを特異的に認識するDNAメチル化酵素遺伝子を推定し、新規の関係性を持つと予測された4組について大腸菌を用いた検証実験を行い、対応関係を実証した。本研究は、未培養系統の微生物が優占する環境微生物のDNAメチル化修飾を世界に先駆けて検証した研究であり、メタエピゲノム解析の有用性を実証するものである。本発表では、本研究の概要を紹介するとともに、技術的な課題や今後の展望等について議論していきたい。

参考文献: Hiraoka, Okazaki, Anda, Toyoda, Nakano, and Iwasaki. Nature Communications. 10, 159. (2019)

S2-1

南極湖沼の硫黄サイクル微生物：優占種の全球分布・ゲノム・プロテオーム

○渡邊 友浩¹, 小島 久弥², 福井 学²

¹マックスプランク研・陸生微生物, ²北大・低温研

E-mail: watanabe1986@gmail.com

南極大陸沿岸には大陸岩盤が露出した地帯があり、そこには雪氷の融解水や海水を起源とする様々な水質の湖沼がある。これら南極湖沼の栄養塩類は乏しいが、過酷を極める陸上環境と比べると湖沼内環境は安定かつ温和であり、微生物を中心とする生態系が築かれている。では、その微生物群集には南極固有の特徴があるのだろうか？本演題ではこの疑問を、硫黄サイクル微生物を例に考察する。微生物による硫黄循環システムは35億年前の太古代地球で発生し、地球の温度低下に応じて機能的・系統的に多様化したと考えられている。このことから類推すると、地球上で最も寒冷な南極の湖沼には固有の硫黄サイクル微生物が存在する可能性がある。我々は、南極の淡水湖（丸湾大池、スカーレン大池、親子池、ウィランズ湖）、寒冷圏の淡水湖（北海道オコタンペ湖）、中温域の淡水湖（滋賀県琵琶湖、山梨県みずがき湖）、亜熱帯の淡水湖（台北フェイツイ湖）の酸化還元境界層付近に発達する硫黄サイクル微生物群集を解析した。それぞれの調査地から、硫酸還元菌、硫黄不均化菌、硫酸酸化菌から成る固有の細菌群集が見出された。その系統学的位置付けから推察すると、亜熱帯から南極の淡水湖沼にかけて共通の淡水種が分布すると考えられる。特に、硫酸以外の電子受容体を利用する硫酸還元菌や硫黄不均化菌の分布域は広がった。硫酸酸化菌群集の主要構成種は化学合成細菌であり、南極の氷底湖ウィランズ湖では *Sulfuricoccus* 属が、丸湾大池では同属に加えて *Sulfuricella denitrificans* が優占していた。前者については中温性の培養株のみが知られていたが、その分布域は永久凍土にも及んでおり、耐冷性または好冷性の未培養種が寒冷圏環境に繁茂していると予想される。後者は耐冷性細菌であり、氷河下堆積物を含む様々な低温環境に分布している。オミクス解析によって、両属の培養株が同じ酵素群を用いて硫黄からエネルギーを獲得すること、この機構が他の淡水性硫酸酸化菌と共通することが明らかになった。以上より、硫酸や硫化物が少ない淡水湖沼には、硫酸に依存しない呼吸（硝酸呼吸や硫黄不均化反応）やATP生産を伴う硫酸酸化機構を利用する淡水種が普遍的に分布しているといえる。すなわち、南極の淡水湖沼の硫黄サイクル微生物は、地理的な隔たりや南極大陸特有の環境条件よりも、淡水湖沼全般に共通する環境因子の影響を強く受けながら進化したと考えられる。

S2-2

無脊椎動物と細菌の共生に着目した新たな雪氷生態系の研究

○村上 匠

国立遺伝学研究所

E-mail: tmurakami@nig.ac.jp

雪氷環境中の細菌や藻類の生理や系統的多様性、ゲノム情報に着目した研究が活発に行われている一方で、雪氷無脊椎動物を中心に据えた研究は小規模であり、知見も限られている。しかし無脊椎動物は、上位消費者として雪氷生態系の一角を担う重要な存在である。したがって無脊椎動物の生態、特に他の生物種との関わり合いを理解することは、雪氷生態系全体の構造を理解する上でも欠かせないであろう。我々は、雪氷無脊椎動物への理解を深めるための手がかりの一つとして「細菌共生」に注目した。近年の目覚ましい研究成果によって、動物に共生する細菌群集の活動が、宿主動物の生存や、生息環境の物質循環に影響を及ぼしうることが明らかとなってきている。そこで我々は、「雪氷無脊椎動物にはどのような細菌が共生しているのか」、「共生細菌は宿主である雪氷無脊椎動物、そして雪氷生態系に対してどのような役割を担っているのか」という点を解明するために、雪氷無脊椎動物の主に腸内細菌叢を対象とした、16S rRNA 遺伝子解析とメタゲノム解析を実施した。解析を進めるにつれ、雪氷無脊椎動物の腸内細菌叢の系統組成は、周囲の雪氷環境と大きく異なることが分かってきた。特に、従来の雪氷微生物研究からは報告例の無い、動物の腸内環境に特異的な細菌系統が、雪氷無脊椎動物の腸内において優占していることが判明した。その一方で、本来雪氷上で活動すると考えられている細菌系統の一部についても、雪氷無脊椎動物の腸内などから特異的に検出されることがわかった。こうした結果は、雪氷無脊椎動物を中心に形成される特異な細菌群集が、雪氷生態系内に存在することを強く示唆している。さらに、メタゲノムデータから再構築された各腸内細菌種のドラフトゲノムを解析することによって、腸内細菌種が有する機能遺伝子、特に糖代謝関連遺伝子の詳細が明らかとなった。こうしたゲノム情報は、雪氷無脊椎動物と細菌群集との共生の実態に迫るうえで重要な手がかりになると考えられる。発表では、このように最新の研究で明らかとなった、雪氷無脊椎動物と細菌群集の共生の詳細を紹介する。そして、無脊椎動物－細菌間の関係に留まらず、より多様な生物種間の関係性を扱う包括的な雪氷生態系の理解に向けて、メタゲノミクスを始めとする解析技術が果たす役割について議論したい。

S2-3

氷河上に形成される微生物群集クリオコナイト粒の光合成特性

○小杉 真貴子^{1,3}, 植竹 淳², 矢野 充啓³, 田淵 ゆり³, 諏訪 裕一³

¹NINS・ABC, ²コロラド州立大, ³中央大・理工

E-mail: kosugi@bio.chuo-u.ac.jp

氷河上の環境は、低温、凍結、強光といったストレスに晒されており、生物の代謝活性を著しく低下させる。こうした極限的な環境にも関わらず、世界各地の氷河表面にはクリオコナイト粒と呼ばれる暗色の微生物群集体が形成され、氷河の融解を早める因子のひとつとして注目されている。クリオコナイト粒の主構成生物であるフィラメント状のシアノバクテリア（ラン藻）は鉱物と絡まることで粒子を形成し、一次生産者として閉鎖的な微生物コミュニティの物質循環に関わっている。本発表では、クリオコナイトの主構成ラン藻の一種である *Phormidesmis priestleyi* の生理生態学的特性について紹介する。北極圏のスピッツベルゲン島にあるニーオルスンの氷河で調査を行い、クリオコナイトの氷河上での光合成および呼吸活性と窒素固定活性の測定を行った。生育環境下で代謝は低く抑えられていたが、天然光下ではクリオコナイト全体の呼吸量を十分に上回る炭酸固定速度を示すことが分かった。また、一般的に低温での活性低下が顕著な窒素固定について安定同位体を用いて測定したところ、微量であるが活性が検出され、更に光合成活性との相関性が示された。多量のエネルギーを必要とする窒素固定活性と光合成活性が何らかの形で密接にリンクしていると考えられる。*P. priestleyi* の光合成活性の温度依存性を測定したところ、本種は好冷性ではなく耐冷性の特徴を示し、30℃付近が活性の至適温度であるが、0℃付近でも活性が維持されていた。一方で凍結により光合成器官は大きく障害を受けることが分かった。凍結と同様に細胞に物理的な障害を引き起こす乾燥ストレスに対しては、全く回復を示さず耐性が無いことが示された。氷河後退域における 16SrRNA による細菌叢解析では、*P. priestleyi* は検出されなかった。したがって、本種は氷河後退域には生育していないことが示唆され、これは乾燥耐性を持たない性質が影響していると考えられる。*P. priestleyi* がクリオコナイトの優占種となる理由を生理生態学的特性の面から考察する。

S2-4

世界の氷河に分布する雪氷藻類とシアノバクテリアの比較と地理的分布

○瀬川 高弘¹, 米澤 隆弘², 松崎 令³, 秋好 歩美⁴, 森 宙史⁵, 竹内 望⁶

¹山梨大学, ²東京農業大学, ³国立環境研究所, ⁴国立極地研究所, ⁵国立遺伝学研究所, ⁶千葉大学

E-mail: tsegawa@yamanashi.ac.jp

近年、各国研究者の間で雪氷上に繁殖する微生物への関心が高まってきている。その理由は、地球温暖化に伴い雪氷環境が急激に変化していることと、予想を上回る近年の雪氷の融解量にこの雪氷微生物が関与していると考えられるからである。光合成微生物のほとんどは緑藻またはシアノバクテリアの仲間、そのうち積雪上では一般に赤雪として知られるような赤い色素をもった緑藻の仲間、氷河の裸氷上では暗色物質クリオコナイトを形成する糸状シアノバクテリアの仲間が繁殖する。雪氷上で光合成を行う独立栄養微生物、そしてその生産物を消費する従属栄養微生物は、雪氷上で増殖して表面の暗色化を引き起こすことが知られている。その暗色化が、氷河表面や残雪の太陽光反射率を減少させ、最終的に雪氷の融解を加速させることが近年報告されている。かつて生物学的にほとんど注目されることがなかった雪氷生態系は、今や氷河変動の現状理解や将来予測をするうえで欠かすことのできない、重要な要素として認知されるようになってきた。したがって、雪氷藻類の種分類、それぞれの繁殖、分散過程を理解することは、雪氷上の生態系の理解および生物を介した氷河や積雪の融解過程の理解にとって重要である。しかしながら、氷河や積雪といった雪氷圏は、極域や高山にそれぞれ地理的に独立して分布していることから、距離的に離れた各地の光合成微生物は同一種なのかどうか、もし同一種だった場合どのくらいの距離を分散可能なのかについてはわかっていなかった。寒冷地でのみで繁殖する雪氷藻類は、気温等の物理的条件で地理分布が制限されているならば、雪氷藻類の分散範囲は気候変動とともに変化してきた可能性がある。そこで北極域やアジア高山域、南極などの世界各地で採取した雪氷サンプルからのDNA解析により、氷河上のシアノバクテリアの世界分布、赤雪の緑藻の両極分布の解析をおこなった。その結果、シアノバクテリアと緑藻では、全球スケールの分散過程に違いがあることがわかった。シアノバクテリアの場合は地理的に明瞭な遺伝的構造があることが示されたのに対し、緑藻の場合は特定の種が全球に共通で、かつ現在も分散、交流している可能性が示唆された。シアノバクテリアと緑藻の世界氷河分布から、氷河変動や気候変動との関係について考察する。

S2-5

古代DNAを用いた微生物の分子進化速度の推定と集団動態・構造解明への応用

○米澤 隆弘¹, 瀬川 高弘²

¹東京農大・農, ²山梨大学 総合分析実験センター

E-mail: cyclotis@gmail.com

分子進化速度は集団動態史や集団の遺伝的分化の時間スケールを理解する上で極めて重要なパラメーターであるにも関わらず、多くの生物種とりわけ細菌類や真菌類では研究が進んでいない。培養下ではゲノムレベルでの解析により数ヶ月から数年間という時間スケールで分子進化速度を推定することは可能だが、自然環境下では細胞分裂の頻度や変異源への被曝量、外界からの選択圧が異なることから分子進化速度が異なることが予測されることに加えて、系図の情報が未知のため絶対時間の基準を入れることが極めて難しい。短い塩基配列であっても新規の突然変異が起きるのに十分な時間スケールのなかで経時的に試料を得られれば、試料年代が絶対時間の基準として働くことから直接的に分子進化速度を推定することが可能である。したがって信頼性の高い古代DNA配列を得ることでこうした問題を解決することができる。その一方で、古代環境試料に由来する微生物のDNA配列と現代の環境からのコンタミネーションとを区別することや、古代試料の年代が統計的に意味のある分子進化速度を得られるのに十分なだけの時間スケールであるかを評価することは困難であった。そこで本発表では、発表者ら自身が提唱する分子進化モデル選択の枠組みでコンタミネーションの評価や試料年代の評価を行う枠組みを紹介し、ここで得られた信頼性の高い分子進化速度をもとに推定したシアノバクテリアの集団動態史について概説する。

E-1

Biogeochemical sulfur isotope fractionation: new insights from biochemistry

○Shawn McGlynn¹, Min Sub Sim²

¹ELSI, Tokyo Institute of Technology, ²Seoul National University, South Korea

E-mail: mcglynn@elsi.jp

Biological isotope fractionations provide the earliest evidence of life on Earth. In this talk I will discuss how the thermodynamic potential of a metabolism can be related to isotope fractionation, and also how biochemistry can help us understand metabolic evolution on Earth. I will focus on microbial sulfate reduction and the determination of enzyme specific kinetic isotope effects, however, the approaches I will discuss can be used in many other systems and can help us understand life today and in the past.

E-2

Evidence of active nitrogen-fixation in hyperthermophilic bacteria from terrestrial hot springs

○ Arisa Nishihara¹, Shawn E. McGlynn^{2,3}, Vera Thiel², Marcus Tank², Masaru K. Nobu¹, Hideyuki Tamaki¹, Shin Haruta²

¹The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), ²Tokyo Metropolitan University,

³Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology (ELSI)

E-mail: arisa.nishihara@aist.go.jp

Biological nitrogen fixation is an important process in global N cycling and accounts for 70% of the bioavailable fixed nitrogen supply to the ecosystems. Prior to our studies, nitrogenase activity in hyperthermophilic bacteria ($\geq 70^\circ\text{C}$) was not demonstrated. In a first study, we detected bulk level nitrogenase activity in dense microbial cell aggregates in slightly alkaline hot springs at $\geq 70^\circ\text{C}$ at Nakabusa (Japan) and analyzed candidate diazotroph in the communities using molecular-based methods. The *nifH* gene amplicon sequence analyses performed with DNA material from Nakabusa hot springs obtained high relative abundance of NifH assigned to three distinct taxa; (i) *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (*Nitrospira*) (91.2% amino acid [AA] sequence identity), (ii) *Thermocrinis albus* and *Hydrogenobacter thermophilus* (*Aquificae*) (91.5-95.6% AA sequence identity), and (iii) *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* (*Firmicutes*) (100% AA sequence identity). We further successfully isolated a novel hyperthermophilic diazotroph *Hydrogenobacter* sp. (*Aquificae*). We demonstrated its nitrogenase activity, and revealed the nitrogen fixation gene cluster arrangement from the isolate's genome sequence. The complete genome of the novel isolate obtained using PacBio is similar to *H.thermophilus* (1.7 Mbp), and contained 1,825 coding gene sequence. A minimum set of six genes for nitrogenase, coding for structural and biosynthetic components (NifHDK and NifENB), were detected in the nitrogenase cluster. Interestingly, the NifK related sequence found in the genome showed a stop codon in the center of the sequence, which suggests that either (1) NifK recovered functionality after the mutation occurred, or (2) another yet unknown enzyme might be involved in nitrogenase assembly in this organism. Our results suggest that biological nitrogen fixation in thermophilic ecosystems is important not only for supplying fixed-N for the community, but also might reveal unusual nitrogenases and their roles.

E-3

Survival strategies of chemolithotrophic acidithiobacilli in nitrogen-limited environments

○ Shohei Yamada, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe

Life Sci, Totyo Univ. Pharm. Life Sci.

E-mail: s19805@toyaku.ac.jp

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic iron-oxidizing gram-negative bacterium that can fix atmospheric nitrogen under ambient conditions, allowing this bacterium to survive in nitrogen-limited environments, such as acid mine drainages. It is known that nitrogen fixation activities of diazotrophs are tightly regulated and expressed only in the absence of bioavailable nitrogen sources in order to save the energy needed for nitrogen fixation. Although the annotated genome of *A. ferrooxidans* suggests that this bacterium has putative regulatory genes for nitrogen fixation, detailed molecular mechanisms have remained unclear. To gain insights into survival strategies of this bacterium under nitrogen-limited environments, we examined nitrogenase activity and transcriptional profiles of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 in the presence and absence of ammonia. We also investigated the growth and nitrogen fixation of this bacterium under the supply of electrons from cathodic electrodes in bioelectrochemical systems (BESs). We found that the expression level and enzymatic activity of nitrogenase were increased in the absence of ammonia, while the expression of *nifA*, a putative transcriptional activator gene flanking to *nifH*, (a structural gene for nitrogenase) was unchanged. We also found that the overexpression of *nifA* increased the nitrogenase activity. These results demonstrate that transcriptional regulation of *nifA* is the key to control the nitrogenase activity in this bacterium. We also found that, compared to conventional batch cultivation, BESs substantially promoted the growth of this bacterium in the absence of ammonia in culture medium, suggesting that efficient supply of the reducing power is important for promoting the growth under nitrogen-limited conditions. We also found that ammonia was produced in culture medium, when the *nifA*-overexpressing strain was grown in BES.

E-4

The microbial coexistence and functional stability corresponding to flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem

○Kenshi Suzuki¹, Azwani Fatma², Masahiro Honjo¹, Kensei Masuda³, Koki Amano^{3,4}, Yosuke Tashiro¹, Hiroyuki Futamata^{1,2,4}

¹Grad. Sch. of Sci. and technol. Shizuoka Univ., ²Putra Malaysia Universiti, ³Grad. sch. of Integr. Sci. and technol. Shizuoka Univ., ⁴Inst. of Green Sci. and Technol. Shizuoka Univ

E-mail: suzuki.kenshi.15@shizuoka.ac.jp

How do multiple microbes coexist and How do microbial community maintain that ecological function? These are fundamental challenges of microbial ecology and biotechnologies. To understand these things, phenol-fed chemostat reactor consisted with phenol-degrading bacteria-*Pseudomonas* sp. LAB-08, *Cupriavidus* sp. P-10, and *Comamonas testosteroni* R2 was constructed as synthetic microbial ecosystem (SME-I). Real-time qPCR technique targeting gene encoding large subunit of phenol hydroxylase (*dmpN*) indicated three strains coexistence over 800 days under substrate limiting condition. Community structure reached an equilibrium in the context of phenol-starvation. LAB-08 and R2 were dominants and P-10 was minor population at equilibrium. Since genome analyses had predicted that all strains had catechol 2,3-dioxygenase (*dmpB*), and also LAB-08 and P-10 had catechol 1,2-dioxygenase (*catA*), gene transcriptional level of *dmpN*, *dmpB* and *catA* were analyzed in SME-II consisted with same strains and conditions to reveal coexistence mechanism. Although LAB-08 and R2 became dominants and P-10 was minor population before phenol-starvation, the cell density of R2 similarly decreased with dilution rate. Phenol-starvation led similar equilibrium with SME-I. The gene transcriptional level of P-10 and R2 fluctuated by phenol-starvation. LAB-08 maintained transcriptional level of each gene on phenol-starvation and these decreased after phenol-starvation. These results indicated that P-10 and R2 sensitively responded to environmental change at the gene transcriptional level. The transcriptional level of *catA* was approximately 10-fold higher than those of *dmpB* even strain P-10 was minor population, suggesting that P-10 secreted metabolites and these were used by LAB-08 and R2. In conclusion, microbial coexistence was obtained with metabolic network and the sensitive responsibility of this network to environmental change enable stable maintenance of system function.

.....

E-5

Analysis of biofilm formation in tight environments

○Andrew S. Utada¹, Kana Morinaga², Tatsuki Kuno¹, Masanori Toyofuku¹, Nobuhiko Nomura¹

¹Dept. of Life and Env. Sci. and MiCS, Univ. of Tsukuba., ²AIST, Tsukuba

E-mail: utada.andrew.gm@u.tsukuba.ac.jp

Bacteria exist either freely or as members of biofilm communities, 3D surface-adhered communities encased in a slimy extracellular matrix. The biofilm lifestyle is fundamental to bacteria biology and ecology, but in many instances the drivers of biofilm formation are unclear. Thus, developing tools to aid in the analysis of biofilm formation may enable control and, ultimately, suppression on unwanted surfaces. Many of the environments with the greatest abundance of bacteria are water filled porous networks. This physical mosaic of fluid networks, full of nooks and crannies, within which the important ingredients for life are maintained but heterogeneously distributed. Due to the variable characteristic length-scales, which may vary from nanometers to meters, gradients in shear flow and porosity heterogeneously distributed dissolved gases, nutrients, repellants, and predators. This heterogenous distribution of important metabolites may contribute to the complex spatial distributions of bacteria in the local environment. Simultaneously, biofilms themselves can structure and change the environment further adding layers of complexity to understanding the ecology of biofilms in the porous environments in which they are found. We use microfluidics to study biofilm development in quasi two-dimensional (2D) systems. We fabricate microfluidic devices that have integrated 2D chambers to trap inoculated bacteria and enable time-lapse observation. The low ceiling of the 2D chamber prevents bacteria from growing on top of each other, thus enabling easier imaging, segmentation, and tracking of trapped bacteria. We aim to model the natural environment while gaining the ability to visualize growth, intercellular interactions, and to analyze biofilm development of bacteria relevant in bioremediation and water treatment. We believe that a deeper understanding of the factors controlling biofilm growth in these conditions will enable targeted utilization of their functions.

E-6

Effects of supplementation to increase bleaching resilience on hermatypic coral microbial community

○Sung-Yin Yang¹, Ikuko Yuyama², Naoko Yasuda³, Sayaka Higa³, Tomihiko Higuchi⁴, Hiroyuki Fujimura³, Toshihiro Miyajima⁴, Takashi Nakamura⁵, Sylvain Agostini^{1,2}

¹Shimoda Mar. Res. Cent., Univ. of Tsukuba, ²Fac. of Life and Env. Sci., Uni. of Tsukuba,

³Dep. of Chem., Bio and Mar. Sci., Uni. of the Ryukyus, ⁴Atm. and Ocean Res. Ins., The Uni. of Tokyo,

⁵Sch. of Env. and Soci., Tokyo Ins. of Tech.

E-mail: syyang@shimoda.tsukuba.ac.jp

The productive coral-Symbiodiniaceae-microbiome symbiosis (coral holobiont) is the foundation of the thriving reef ecosystem. The photosymbionts exchange nutrients and provide carbon source to their host, while the microbiome has been shown to be essential for coral health through its role in nutrient cycle, resistance and resilience to stress and pathogen control. However, the balance of the symbiosis is easily broken under various stresses, especially high sea water temperature. Over the past decades, climate change has lead to an increase in the frequency of mass coral bleaching, the loss of the photosymbiont. During the last mass bleaching event of 2016, 97% of the corals in the largest coral reef of Japan, bleached, resulting in the loss of more than 50% in coral coverage. The last report by the Intergovernmental Panel on Climate Change, states that without reduction of greenhouse gas emissions, 70% to 90% of the coral reefs around the world will disappear by 2030. While ocean warming is hard to manage in a short term, actions to mitigate its impact on coral reefs can be developed. Our group is testing the effects of supplements to assist corals in overcoming bleaching events. We targeted three type of supplements, Artemia as nutrient, and, Iron and Manganese enriched yeast to provide additional metals required for the superoxide dismutase enzymes that reduce the stress from reactive oxygen species produced under heat stress. We monitored the changed in the microbiome composition along with the host and photosymbiont physiology under different supplementation, control and heat stress (27 ° C and 31 ° C) for the common hermatypic coral, *Acropora hyacinthus*. We expect to see a drastic change in the associated microbial community under heat stress, change that may be mitigated by the supplementation, especially under the Artemia treatment which was the most effective in increasing the resilience of the corals to the heat stress.

.....

E-7

Azo dye decolorization by *Enterococcus faecalis* azoreductase activity is enhanced by co-culture with *Bacillus* sp.

○Yu Yamanashi, Tsukasa Ito

Dept. of Environ. Eng. Sci., Gunma Univ.

E-mail: t172c002@gunma-u.ac.jp

Textile wastewater discharged into rivers is a serious problem worldwide. Therefore, it is necessary to develop more efficient microbial decolorization processes for sustainable wastewater management. Recently, the reports of dye-decolorizing bacteria have increased and several studies reported that bacterial consortia decolorized dyes more efficiently than single strains. It is important to understand the optimal bacterial consortia for the decolorization processes, and the underlying mechanisms of such consortia. We investigated these issues by comparing the decolorization activity of a mixed culture with that of single strain cultures under various growth conditions and cell densities. We used two isolated strains: *Enterococcus faecalis* strain T6-a1 with dye decolorizing azoreductase activity, and *Bacillus subtilis* strain S4-ga that did not have dye decolorizing activity. The dye decolorization rate of the mixed culture of the T6-a1 and S4-ga strains was almost twice as fast as that of the T6-a1 strain single culture despite the same cell density of the T6-a1 strain in both the cases. In our study, although T6-a1 and S4-ga strains did not affect each other's growth when mixed, the redox potential (ORP) of the mixed culture was lowered by the S4-ga strain when the T6-a1 strain was mixed with the S4-ga strain. Interestingly, the ORP value of the mixed culture under aerobic cultivation was lower than that under N₂-purged anaerobic cultivation. At the same time, the dye decolorization activity of the mixed culture was accelerated under the aerobic condition compared to that under the anaerobic conditions. These results indicated that the decolorization activity of the T6-a1 strain was enhanced not only by the lowered dissolved oxygen and ORP, but also by some interaction with the S4-ga strain.

E-8

Linking seasonal dynamics of Megaviridae and bloom forming eukaryotic phytoplankton in Uranouchi inlet, Japan

○ Florian Proding¹, Hisashi Endo¹, Yanze Li¹, Kento Tominaga², Tatsuhiro Isozaki², Yasuhiro Gotoh³, Takashi Yoshida², Hiroyuki Ogata¹

¹Bioinformatics center, Kyoto University, ²Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

³Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

E-mail: florian@kuicr.kyoto-u.ac.jp

“Megaviridae” is a proposed group of NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses). Recent studies have not only confirmed that several phytoplankton species are preyed upon by these giant viruses, but have also shown that Megaviridae are able to shut down algal blooms. After Megaviridae have been proven abundant in the ocean, an amplicon based sequencing method revealed their high diversity in several other aquatic environments of Japan. In this study, we investigate seawater samples collected from Uranouchi inlet, Kochi, Japan. We obtained 43 samples over 18 months from January 2017. The inlet is home to several blooming algal species. These blooms occur unpredictably, hence sampling was performed sporadically with higher sampling frequencies during blooming periods. We used an 18S rRNA amplification method and publicly available cell count data to assess the change in community structure of eukaryotic plankton and bloom-forming species, respectively. We explored Megaviridae diversity by using a set of 82 degenerate primers (“MEGAPRIMER”) targeting polymerase B genes of Megaviridae. We utilized different co-occurrence models and machine learning methods on the generated data to investigate the association of algal and Megaviridae communities, revealing their complex interaction networks.

01-01

ロドプシンから探るシアノバクテリアの多様な光利用

○長谷川 万純^{1,2}, 西村 陽介¹, 吉澤 晋^{1,2}

¹東大・大海研, ²東大・院新領域

E-mail: hasegawa.m@aori.u-tokyo.ac.jp

シアノバクテリアは、主にクロロフィル *a*を用いて赤色と青色の光を利用し、光合成を行う。一方で、近年の遺伝子解析技術の発展に伴いロドプシンによる光利用機構も幅広い微生物分類群に分布していることが明らかとなってきた。ロドプシンはレチナル色素を発色団とする光受容タンパク質であり、多くのタンパク質と色素を必要とする光合成系と比較して非常に単純な構造を持つ。ロドプシンはその機能から、イオン輸送型とセンサー型の二種類に大別され、その利用波長も非常に多様であり、海洋細菌が持つプロテオロドプシンは青色光を、高塩古細菌の持つバクテリオロドプシンは橙色光を利用することが知られている。これまでロドプシンを用いた光利用機構は従属栄養細菌に特有であると考えられてきたが、シアノバクテリアからも複数のロドプシンが報告されており (Jung et al. 2003, Mongodin et al. 2005, Hasemi et al. 2016, Niho et al. 2017, Hasegawa et al. in prep.), シアノバクテリアがクロロフィルのみならずロドプシンを用いて光を利用している可能性が示唆されている。しかしながら、ロドプシン遺伝子がシアノバクテリア内にどの程度分布し、何色の光を、どのように利用するのかなどの基礎的な知見も殆どない。

本研究では、大規模ゲノム解析をすることでシアノバクテリアにおけるロドプシン遺伝子の分布とその系統を、また見出したロドプシンの機能と利用波長を異種発現解析から網羅的に調べた。その結果、ロドプシン遺伝子はシアノバクテリアの系統に広く分布すること、またシアノバクテリアは多様な系統のロドプシン遺伝子を持つことが明らかとなった。さらに、異種発現解析から、シアノバクテリアの持つロドプシンは、系統的・機能的に多様であるにも関わらず、利用波長が緑色光領域に制限されていることが分かった。この結果は、クロロフィルとロドプシンの両方を用いて効率よく光利用を行うため、ロドプシンの利用波長が光合成では利用されない緑色光領域に適応した可能性を示唆している。今後、様々な培養条件下における発現解析を行い、シアノバクテリア細胞内におけるロドプシンの生理的役割や光合成との共存メカニズムを調べることで、光合成独立栄養生物が持つロドプシンの役割を明らかにしたい。

01-02

海洋真核生物ラビリンチュラ類の生態学的役割と影響

浜本 洋子^{1,2}, 庄野 孝範¹, 中井 亮佑³, 上田 真由美⁴, 長井 敏⁵, ○本多 大輔^{1,2}

¹甲南大・理工, ²甲南大・統合ニューロ研, ³産総研, ⁴大阪環農水研, ⁵水研セ・中央水研

ラビリンチュラ類は、世界中の海洋に広く生息している従属栄養性の直径 10 μ m 程度の単細胞真核生物である。これまで、セルラーゼなどの難分解性有機物に対する分解酵素を分泌することから、生態系における分解者として認識されてきた。しかし、我々の最近の研究によって、ラビリンチュラ類の 1 属である *Aplanochytrium* が生きている珪藻から栄養を摂取することを明らかとなり、未解明の生食連鎖の経路があることが予想された (Hamamoto and Honda (2019) PLoS ONE 14(1): e0208941)。そこで本研究では、*Aplanochytrium* に着目し、この現存量を計測することから、ラビリンチュラ類全体が海洋生態系に与える影響力を評価した。

大阪湾において、2017年5月から2018年4月までサンプリングをおこない、*Aplanochytrium* の細胞密度を測定した。その結果、1年間の *Aplanochytrium* の細胞密度の平均は湾央で 2,100 cells/L、湾奥で 13,000 cells/L であった。また、次世代シーケンシング (NGS) を用いて1年間のラビリンチュラ類の群集構造解析を行った結果、ラビリンチュラ類全体のうち、*Aplanochytrium* が湾央で 77.1% (min 0.0 ~ max 100.0%)、湾奥で 67.8% (min 0.0 ~ max 100.0%) を占めることが明らかになった。さらに、ラビリンチュラ類の単位面積あたりの年間の炭素生産量を試算し、瀬戸内海で示されている炭素循環に適用して影響力を評価した。その結果、湾央と湾奥に生息するラビリンチュラ類は、真核生物に消費される植物プランクトンの炭素のうちそれぞれ 6.1%、19.0% を消費し、微小動物プランクトンが消費する炭素のうち 3.6%、16.2%、また、植物食性動物プランクトンでは 1.8%、6.3% を供給していると推定された。カイアシ類の食性解析では、カイアシ類は接餌した原生生物のうち、渦鞭毛藻類 (約 41%)、繊毛虫類 (約 36%)、珪藻 (約 15%)、ナノ鞭毛藻類 (約 6%)、その他の微細藻類 (約 3%) を占めることが報告されている (Yang et al., (2009) Journal of Plankton Research, 31(6), 647-659)。以上のことから、ラビリンチュラ類は、浮遊生態系を理解するうえで不可欠な生物群であるナノ鞭毛藻類などと同程度の炭素を供給していることが示唆された。

01-03

海洋性真核微細藻類が原核生物群集構造に与える影響に関する研究

○武部 紘明¹, 富永 賢人¹, 磯崎 達大¹, 山本 圭吾², 渡邊 哲弘¹, 吉田 天士¹

¹京大院農, ²大阪環農水総研

E-mail: takebe.hiroaki.42n@st.kyoto-u.ac.jp

【目的】微細藻類は海洋の一次生産を担い、生産された有機物の少なくとも半分を、海洋性原核生物が基質として消費する。微細藻類は種ごとに異なる組成の有機物を環境中に放出するとされる。従って原核生物の群集構造は、各藻類種が生成する有機物組成の差異に影響を受けると考えられるが、その違いは未解明である。そこで本研究では、二種の真核微細藻類由来の有機物が原核生物群集に与える影響の違いを明らかにするため、マイクロゾム系を構築し、原核生物群集構造の遷移を比較した。

【手法】*Heterosigma akashiwo* (NIES-293 株) と *Chaetoceros sp.* (NIES-3717 株) を f/2 培地を用いて対数増殖後期まで培養した。2種の培養液中の細胞を洗浄後に破碎し、両種に由来する有機物画分 Ch と Cc を得た。大阪湾で採取した海水を孔径 3.0 μ m、0.2 μ m のフィルターで濾過した。孔径 0.2 μ m のフィルター上に捕集した原核生物を熟成滅菌海水に懸濁し、Ch および Cc 添加区と、有機物を添加しない対照区を作成した。一週間培養を行い、毎日試料を採取した。各試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的にアンプリコン解析を行った。得られた配列を相同性 99% に基づきクラスタリングし、操作的分類単位 (OTU) を作成した。全 OTU のうち培養中の平均相対量が 0.4% 以上、または一日でも相対量 2.5% を超えたものを優占 OTU とした。

【結果】シーケンシングにより、Ch 添加区、Cc 添加区、対照区でそれぞれ合計 599,769 配列、549,439 配列、731,581 配列が得られ、18,201 OTUs、15,094 OTUs、17,486 OTUs を抽出した。まず Shannon 指数に基づき各実験区の α 多様性を調べると、Ch 添加区は他の 2 つの実験区よりも多様性が有意に低かった ($p < 0.001$)。次に Bray-curtis 非類似度に基づき全試料の菌叢を比較すると、培養 2 日目以降、対照区と有機物添加区で菌叢は異なり、2 種の有機物添加区間でも差が生じた。優占 OTU (85 個) に注目すると、Ch 添加区で 11 個、Cc 添加区で 12 個の特異的に出現する優占 OTU が得られた。Ch 添加区では *Rhodobacterales* 目や *Flavobacteriales* 目、Cc 添加区では *Alteromonadales* 目や *Vibrionales* 目に属する OTU が優占した。これらは全て従属栄養細菌であり、添加した有機物に反応して優占したと示唆された。さらに各優占 OTU の相対量は培養経過に伴い日ごとに大きく変化した。以上より藻類種の差異に伴う有機物組成の違いが、微生物群集構造の遷移に影響を及ぼすことが示唆された。

01-04

微生物由来蓄電性Mackinawiteが嫌気微生物生態系に及ぼす影響

○安池 一貴¹, 片桐 美紀², 工藤 優輝¹, 大前 貴裕², 田代 陽介^{1,3}, 二又 裕之^{1,3,4}

¹静岡大・院工, ²静岡大・工, ³静岡大・創造大学院, ⁴静岡大・グリーン研

E-mail: yasuike.kazuki.15@shizuoka.ac.jp

嫌気微生物の中には細胞外電子伝達により他の微生物と共生的代謝をすることが知られており、導電性鉱物を介した微生物電子共生は共生的代謝を促進させる報告がある。そのため、電気エネルギーは光エネルギーおよび化学エネルギーに次ぐ第3のエネルギー源として注目されている。本研究室で分離された硫酸還元細菌*Desulfovibrio* sp. HK-IIを硫酸還元条件および鉄存在下で培養すると蓄電性バイオミネラル (Rechargeable bio-mineral: RBM) であるMackinawite ($Fe_{x+1}S_xO_{-0.11}$) を生成することが知られている。Mackinawiteは深海海底土圏など嫌気環境に遍在しているため、RBMを中心とした微生物電子共生系が構築されていると考えられるが、未だそのような報告はない。そこで本研究ではRBM存在下における嫌気微生物生態系の構築および代謝評価を行った。

汽水湖底泥を摂取源とし、4 mM乳酸およびRBMを添加した系 (RBM系) および対照系としてRBM無添加系 (Control系) を構築し、経時的に有機酸濃度測定を行った。乳酸消費後、乳酸添加を2回実施した後に培地上清95%を除去し、新鮮な培地を加える継代回分培養を数日間実施した。その結果、両培養系において乳酸の消費に伴う酢酸およびプロピオン酸の生成、酢酸の消費に伴うメタンの生成が確認された。Control系と比較するとRBM系では酢酸消費速度およびメタン生成速度は約1.9倍および1.5倍高いことが示され、両培養系で代謝活性の違いが確認された。さらに代謝活性の違いが微生物群集の違いに起因するのかどうかを確認するために、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGEの結果を基にMDS解析をした結果、Control系とRBM系のみならず各培養系の上清と沈殿物においても異なる微生物群集構造の形成が確認された。微生物の空間的分布を調べるためにSYBER GREEN Iを用いて蛍光顕微鏡観察をしたところ、RBM系ではRBM上への偏在が観察された。さらに、酸化還元物質の存在とその反応電位を調べるためDPV測定を行った結果、RBM系にのみピークが存在したため、Control系と異なりRBM系ではメディエーターを介した電気化学的代謝を行っていることが示唆された。両培養系の反応性を調べるためにギブズ自由エネルギーを算出した結果、RBM系はControl系と比較して負に大きいことが示された。本研究ではRBMは特異的な微生物群集の集積を可能とし、RBMを中心とした電子共生を行っていることが示唆された。

01-05

廃飲料メタン発酵における基質高負荷時の菌相変動解析

○松田 修平¹, 山登 貴広¹, 望月 誉志幸², 関口 喜則², 大槻 隆司¹

¹山梨大院・医工農, ²磐田化学工業

【背景・目的】廃飲料は有機物を豊富に含み、メタン発酵における基質として非常に有用である。しかし、メタン発酵というのは無数の微生物の生命活動により成り立っており、メタン生成プロセスが複雑なため人為的に制御することが困難である。また、基質投入時のpH低下にしばしば悩まされることがあり、一度メタン生成が抑制されてしまうと回復を図ることは容易ではない。本研究は、廃飲料メタン発酵において基質高負荷時にpHが低下してしまう状況を再現し、ナノポアシーケンサーを用いてpH低下時の菌相変動を明らかにすることを目的とした。【方法】30 mL容ガスクロバイアルにて模擬廃飲料混合物 (SBWM) を基質としてバッチ培養を行った。SBWM添加量は0,0.5,2,5,10 mLとし、静岡県で実稼働しているメタン発酵槽より採取した汚泥を、当研究室でジャーファーメンターを用いてSBWMに順化させたものを微生物接種源として10 mL加えた。さらに、SBWM10 mL添加試験区を除く試験区にはイオン交換水を加え、全量20 mLとしたのちに気相を窒素置換し15日間55℃にて静置培養した。5日おきにメタン生産量を測定するとともに培養液をサンプリングし、遠心後、上清のpHおよびVFA濃度測定を行なった。培養終了後、サンプリング時に回収した菌体よりDNAを抽出した。さらにPCRを行い、Oxford Nanopore TechnologiesのMinIONを用いて16S rRNA遺伝子解析をすることで微生物群を構成する微生物の推定並びに構成割合の変動を調べた。【結果・考察】培養15日後の積算メタン生産量は負荷5 mL試験区で970 mL/L_{culture}となり最も多かった。一方、負荷10 mL試験区の積算メタン生産量は299 mL/L_{culture}となり、pHの著しい低下とメタン生産の抑制が見られた。VFA濃度測定の結果から、添加量が増加するにつれて酢酸の蓄積量が増加したため、pH低下の原因であることが示唆された。16S rRNA遺伝子解析の結果、いずれの試験区においても、真正細菌は*Coprothermobacter proteolyticus*、古細菌は*Methanotheroxiphilum* の構成割合が最も高かった。また、高負荷になるにつれて*Symbiobacterium thermophilum*、*Chrostridium chauvoei* の2種の構成割合が著しく増大し、pHの低下とメタン生産の抑制に深く関与しているのではないかと考えられた。

01-06

リアルタイム浮遊菌数測定と生態解析によって室内浮遊菌の実態に迫る

○中村 孝道¹, 谷口 恵梨¹, 佐藤 嘉則²¹熊谷組・技研地球環境, ²東文研・保存科学セ・生物

E-mail: takamichi.nakamura@ku.kumagaigumi.co.jp

背景：カビ毒やアレルギー疾患、真菌症などの病原となることから、カビ汚染は室内環境汚染のなかでも重要視されている。浮遊菌の測定は、エアサンプラーを用いた培地への空気質の吹付による培養法を基本としている。培養法では選択した培地や浮遊している菌の種類の影響でごく一部の浮遊菌しか捉えることができず、また測定に数日以上を要するという欠点がある。さらには、研究例が限定的なため浮遊菌の生態の実態は不明であることから、発生するカビ、培地培養で生えるカビ、浮遊するカビ胞子およびその量の関係性は全く分かっていない。

目的：室内環境における浮遊菌の実態調査を目的とした。様々な室内環境を対象に培養法に拠らないリアルタイム浮遊菌数測定と生態解析を実施しデータを蓄積し、培養法に拠らない室内環境浮遊菌数測定が衛生的基準化や管理指標として有用性があるか検討した。

方法：一般住宅、事務所、作業所を調査対象とした。微生物センサ（シャープ）および温湿度計により連続データを取得した。エアサンプラーによる浮遊菌測定を定期的に3回実施した。液体サイクロンエアサンプラーを使用して空気質を採取し、そこからDNAを抽出した。真菌ITS領域を対象にPCR増幅し、得られた産物のアンプリコン解析を行うことで試料中に含まれる浮遊菌の分子生態解析を行った。

結果：微生物センサによる浮遊菌推定値は培養法で得られるCFUの100～1000倍であった。培養法では測定しきれていない浮遊菌をリアルタイムで連続測定することができた。人の出入りや外気の流入などにも敏感に反応しており、得られたデータは妥当性があると考えられる。生態解析の結果においては、未培養真菌類の存在が多いことが分かった。つまり、室内環境においては、培養法では捉えきれない浮遊菌が多く存在していることが示された。また、壁などに発生するクロカビ等の存在はほとんど確認できず、さらには、住環境以外では病原性真菌類はほぼ存在しないことがわかった。したがって、ある程度の浮遊菌量で制御できていれば、適切に温湿度を管理することでカビ発生やカビが引き起こす感染症などのリスクを十分に下げることができると考えられる。すなわち、微生物センサによるリアルタイム浮遊菌測定は、室内空気質微生物汚染の測定に大変有効であり、管理指標として有効的に活用できるものと考えられる。

01-07

水田土壌における鉄還元菌窒素固定の発見と検証

○増田 曜子¹, Zhenxing Xu¹, 山中 遥加¹, 伊藤 英臣², 白鳥 豊³, 妹尾 啓史^{1,4}¹東京大・院農, ²産総研・北海道センター, ³新潟農総研, ⁴東大微生物連携機構

E-mail: ygigico@gmail.com

「麦は肥料で、米は地力でとる」と古くから言い伝えられてきた。これは、畑作では作物の生育が施肥に大きく依存するのに対し、水田では水稻の生育を土壌の窒素肥沃度（地力窒素）が支えていることを意味している。窒素肥沃度の維持には、土壌への窒素供給経路である微生物の窒素固定反応が重要である。水田土壌においては、窒素固定微生物として *Cyanobacteria* が注目され長年研究されてきた。近年、新潟県農業総合研究所内の連作水田土壌を対象としたメタトランスクリプトーム解析によって、我々はこの既往概念を覆す発見に至った。得られたRNA配列から窒素固定遺伝子（*nif*）転写産物の由来微生物を調べたところ、驚くべきことに、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌（*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌）由来のものが最も高頻度に検出された。これらの細菌は水田土壌の最優占種である。また、日本各地の水田土壌を対象としたメタゲノム解析を行ったところ、これらの鉄還元菌由来の *nif* 遺伝子がいずれの土壌においても高頻度に検出された。以上のことから、「鉄還元菌による窒素固定」は水田土壌における普遍的事象である可能性が考えられた。そこで、これら鉄還元菌の分離株を用いて窒素固定能の検証を行った。供試菌株は、ヒ素汚染土壌から単離された *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株ならびに我々が水田土壌から単離した *Anaeromyxobacter* sp. Red267 株（両菌株とも *nif* を保有）とした。その結果、これらは液体培地中だけでなく水田土壌マイクロコズムにおいても窒素固定活性を示した。また、これらの窒素固定活性は、培地中の Fe^{3+} 濃度によって変化することが明らかとなった。これは *Anaeromyxobacter* の窒素固定活性を確認した初めての例である。一方、高い窒素固定活性を示す複数の *Geobacter* 属細菌の新種を水田土壌から単離することにも成功した。以上の結果は、これら鉄還元細菌が水田土壌において窒素固定を行っていることを強く示唆するものである。謝辞：PSR-1 株を分与して下さいました天知誠吾博士（千葉大学）、窒素固定活性測定に協力をいただきました青野俊裕博士（東大生物生産工学研究センター）に深く感謝します。

01-08

稲わらとぼかし肥料の併用が水田土壌からの温室効果ガス生成および水稲の生育・収量に及ぼす影響

○犬伏 和之, 長澤 崇, 谷道 拓郎, 李 セン, HMWE Kyu Kyu

千葉大・院園芸

E-mail: inubushi@faculty.chiba-u.jp

背景・目的：水稲栽培では、水稲生育と地力向上のため稲わらや有機質肥料が施用されるが、こうした有機物は嫌氣的に分解され温室効果ガス、メタン (CH₄) 生成の基質となり地球温暖化を助長する。そこでCH₄抑制技術の一つとして製鋼スラグ等の含鉄資材の施用が提案され、これまでにCH₄放出量の6-34%抑制、単位収量あたりのCH₄放出量の減少等がポット試験で報告されている。一方で、ぼかし肥料など有機質肥料等と含鉄資材を併用した場合の温室効果ガス生成・放出に関する報告は少ない。本研究では、ぼかし肥料と含鉄資材の併用がCH₄放出および水稲生育・収量に及ぼす影響を水田圃場で検証し、ぼかし肥料および含鉄資材の適切な利用法を開発することを目的とした。実験方法：千葉県横芝光町の農家水田（中粗粒グライ低地土）に2017年には含鉄資材（ミネカル）とぼかし肥料を併用した区、'18年には含鉄資材2種（農力アップ、ミネカル）とぼかし肥料を併用した区を設け、ぼかし単用区および化学肥料単用区と比較して、水稲生育期間中にCH₄放出量をチャンバー法で測定し、水稲生育および収量、'18年にはReal-time PCR (16S, mrcA53)法により土壌微生物量とCH₄生成菌活性を評価した。結果・考察：CH₄フラックスは'17年には、ぼかし単用区>ミネカル併用区≧化学肥料区となり、含鉄資材のCH₄放出抑制効果が確認できた。'18年は農力アップ併用区>ミネカル併用区≧化学肥料区の順に高くなり、'17年と比較して全試験区で大幅に増大した。'18年は記録的猛暑だったためCH₄放出抑制効果が確認できなかったと考えられる。含鉄資材を併用した2区で差が出たのは、含鉄資材に含まれる鉄含量およびアルカリ成分の影響が考えられる。ミネカルの鉄含量は農力アップの約2倍あり、電子受容体として機能しCH₄生成が抑制されたか、mrcA53がミネカル併用区≧農力アップであったことから、ミネカル施用で高pH化しCH₄生成古細菌の活性が抑制されたと考えられた。収量は'18年で含鉄資材併用区の一穂粒数の有意な増加が見られた。ミネカル併用区では'17年でも同様の結果が得られたが、'18年では'17年に比べ、猛暑や初夏の日照不足で穂数が減少し減収した。ぼかし肥料と含鉄資材の併用はケイ酸が供給され一穂粒数が増加することによる増収が期待できると示唆された。

01-09

地下圏の脱窒とメタン生成の有機物利用における競合: 菌叢の違いは関係ない?

○芦沼 完太¹, 松下 慎², 木村 浩之³

¹静岡大・院理・地球, ²産総研, ³静岡大・理・地球

E-mail: ashinuma.kanta.14@cii.shizuoka.ac.jp

海洋プレートの沈み込みによって形成された付加体の深部地下には嫌気性の地下温水と、CH₄、N₂を主成分とする天然ガスを大量に含む帯水層が存在している。先行研究によって、深部帯水層では水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌の共生によってメタン生成が起きていることが明らかにされている。一方、天然ガス中のN₂の起源は微生物による脱窒による可能性があるが、詳細は不明である。一般的に、脱窒に関する研究は主に土壌、河川や湖沼の堆積物、海底堆積物が対象であり、深部帯水層における脱窒についてはほとんど研究されていない。しかし、地球規模での窒素循環の理解を深めるには、表層だけでなく地下における脱窒についても吟味することが重要である。本研究では付加体分布域の静岡県内の4つの掘削井から嫌気性の地下温水と天然ガスを採取した。化学分析の結果、天然ガスの主成分はCH₄ (36.7-96.9%)であったものの、N₂ (0.79-63.2%)も含まれていた。さらに、天然ガスのN₂/Ar比は13から241を示し、空気が飽和した水の値(40)よりも有意に高いサイトが存在した。この結果は、天然ガスに含まれるN₂が深部帯水層で生成されたことを示している。地下温水に含まれる微生物群集からDNAを抽出し、脱窒菌のバイオマーカーである亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子 (*nirS*および*nirK*)を対象としたクローニング・シーケンス解析および定量PCRを行った。さらに、16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンサー解析を行った。その結果、主に α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteriaに由来する*nirS*および*nirK*が検出され、それらの機能遺伝子の量はサイトごとに有意に異なっていた。また、地下温水に有機基質を添加したメタン生成菌群集を対象とした嫌気培養および有機基質と硝酸(または亜硝酸)を添加した脱窒菌を対象とした嫌気培養を行った。その結果、脱窒菌とメタン生成菌群集の間で有機物利用における競合が起きており、硝酸または亜硝酸の存在下においては脱窒菌によるN₂生成が優位であることが示された。さらに、各サイトにおいて天然ガスに占めるN₂の割合が異なる原因は、深部帯水層における菌叢の違いや脱窒菌の菌叢の違いではなく、深部帯水層への硝酸または亜硝酸の供給量が影響していると推定される。

01-10

土壌のバクテリア群集の窒素応答は進化系統的に保存されている

○磯部 一夫

東京大

E-mail: akisobe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

土壌に生息する豊富で多様なバクテリア群集は動植物遺体の分解、物質循環の形成、植物への養分供給、炭素や窒素の貯蔵などの機能を担い、生態系を支えている。そのため生態系が環境の変動に対してどのように応答するのかを理解するためには、土壌に生息するバクテリア群集の環境応答を理解することが重要である。しかしバクテリアはわずか1グラムの土壌に数千種もいると推定されるほど多様であるために、土壌に生息するバクテリア群集の環境応答を予測することは非常に困難である。本研究では、バクテリア群集の環境応答は進化系統的に保存されている(進化系統的に近いバクテリアは環境の変動に対して類似の応答を示す)という仮説を立て、検証した。

バクテリア群集の窒素施肥に対する応答に着目し、世界13地点(森林、農耕地、草地)で行われた窒素施肥実験において得られたバクテリア群集組成のメタ解析を行った。それぞれの地点で、群集内の各バクテリアの窒素施肥に対する応答(存在量が増えるか減るか)を算出し、その応答が進化系統的に保存されているかどうかを検証した。続いて、13地点のうち多くの地点で検出されたバクテリアに着目し、それらバクテリアの応答が、異なる環境下でも一様の応答を示すか、環境毎に異なる応答を示すかを検証した。

その結果、バクテリアの窒素施肥に対する応答は、検証した13地点のうち12地点において進化系統的に保存されていた。続いて、すべての地点のデータを合わせた際に見られる窒素施肥に対する応答の系統パターンは各地点で見られた応答の系統パターンと類似していることが認められた。このことから、多くのバクテリアは環境条件(生態系や窒素施肥量)が異なっても窒素施肥という環境変化に対し一様の応答を示すと考えられ、それらの系統を特定することができた。以上の結果は、進化系統情報を用いることで窒素施肥に対してバクテリア群集の組成がどのように変化するのかを予測できる可能性があることを示している。

01-11

地球規模で分布するN₂O放出ホットスポットから強力なN₂O消去能をもつ *Chitinophaga* 属細菌の探索

○橋床 泰之¹, 祐太 高津¹, Sharon YL Lau^{1,2}, Tahvanainen Teemu³

¹北海道大・院農, ²STPRI, Malaysia, ³Univ. Eastern Finland

E-mail: yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp

【背景】亜酸化窒素(N₂O)は等モル量当たり二酸化炭素の約300倍もの温室効果を示す、化学的に安定なガスで、オゾン層破壊原因物質としても知られている。熱帯から温・冷帯、ツンドラ帯の亜北極まで、広くN₂O放出ホットスポットが存在し、多くはヒトによる土地攪乱、過度な施肥、汚水の流入、ならびに地球温暖化に起因している。N₂O生成は、脱窒(嫌氣的硝酸塩呼吸)によるNO₃⁻からN₂への還元途中で、N₂Oを最終電子受容体として大気中に放出してしまう不完全脱窒がかなりの部分(70-90%)を占めると考えられている。N₂OをN₂に還元するN₂Oリダクターゼ(N₂OR)は、酸性条件下あるいは低温条件下で不活性化する。そのため、酸性土壌や寒冷地に棲息する脱窒細菌ではN₂ORが十分に機能しないか、その遺伝子(*nosZ*等)自体の欠落が起り、N₂O放出微生物として振る舞うことになる。熱帯泥炭開墾地土壌から*Burkholderia*属細菌等を、北海道の黒ボク土畑地圃場からは*Pseudomonas*属細菌等を強力なN₂O放出細菌として分離・同定している。これらのスクリーニングの途上で、N₂O消去に関わる細菌を見出したため、それらの同定を試みた。【方法・結果・考察】N₂O放出細菌のスクリーニングにおいて、培養開始期のヘッドスペースに存在する大気由来のN₂O(0.4 ppmv)が完全なゼロレベルにまで消去されたものが認められたため、N₂O消去能を有する土壌微生物の探索を並行して進めた。土壌懸濁液を接種した低窒素培地ジェランガム培地(pH 4.5)に出現したコロニーを分離し、10000 ppmvのN₂Oが封入されたソフトゲル培地で単独培養した。その結果、10000 ppmvのN₂Oを1週間以内にゼロレベルにまで消去する細菌株をそれぞれの土壌から分離することに成功した。これらは、熱帯と冷帯から得た土壌がそれぞれの分離源であるにもかかわらず、同定したN₂O消去細菌は明らかに種が異なるが同属の*Chitinophaga* spp.であった。前者はNGSにかけ、N₂O消去に関わると考えられる遺伝子クラスターを同定した。また、硝酸アニオン、亜硝酸アニオンの増長を追跡した。さらに北極域で採取し、N₂O消去活性が高いパルサ崩壊地土壌サンプルからも、NGSによる菌叢解析で*Chitinophagaceae*が比較的高比率に出現していた。そのため、この土壌からもN₂O消去細菌として*Chitinophaga*属細菌が得られる可能性がある。*Chitinophaga*が共通して持つ消去機構と窒素循環に果たす役割を検討する必要がある。

01-12

拮抗菌 *Bacillus amyloliquefaciens* の阿蘇地域での生態的地位

○染谷 孝, 龍田 典子, 上野 大介

佐賀大・農

E-mail: someyat@cc.saga-u.ac.jp

【目的】熊本県阿蘇地方では草原に自生するススキやカヤなどの野草を秋に収穫して大きなロール状ないし刈り芝状にして野外に置き、風雨に半年以上さらして自然に腐熟させたものを野草堆肥と呼び、有機質肥料として田畑に混合施用ないしマルチ施用している。これにより植物病害が軽減されると経験的に言われており、それを検証するために、野草堆肥およびその施用土壌に含有する拮抗菌を定量・分離し、その生態を探った。【方法】2015年-2017年に阿蘇の8地点から、乾燥保管している野草ロール、熟成した野草堆肥、その施用土壌の計55点を採取した。これらの試料に含有する、*Fusarium oxysporum* F. sp. *cepae*に対する拮抗菌を当研究室で開発した直接選抜培養法を用いて定量した。すなわち、Nutrient Agar (NA)3連に上記糸状菌胞子懸濁液 (10^5 spores/mL) と土壌や野草堆肥試料の希釈懸濁液 (10^3 - 10^5) を各100 μ L塗抹接種し、30°Cで5日間培養し、発育阻止円を形成するコロニーを拮抗菌として計数し、分離純化した。【結果】*F. oxysporum*に対する拮抗菌は野草ロールでは 10^4 - 10^5 CFU/g乾物、野草堆肥では 10^4 - 10^8 CFU/g乾物、その施用土壌では 10^4 - 10^8 CFU/g乾土存在し、野草を堆肥化することで拮抗菌が増殖すること、施用土壌に定着することが示唆された。拮抗菌は*Bacillus*属細菌および放線菌で、前者の多くは*Fusarium*のみならず、*Ralstonia*および*Pythium*に対しても拮抗能を示したが、後者は*Fusarium*のみに拮抗能を示した。APIおよび16S rRNAの解析により、時期も分離源も異なる*Bacillus*属拮抗菌分離株20株はほぼすべて同一のクローンであることが判明した。一方、NAで非特異的に分離純化して得られた*Bacillus*属細菌は多様であった。また放線菌は分離源を問わず*Streptomyces*属の特定の菌種 (*S. albidoflavus*) であった。【考察】阿蘇地方から分離された拮抗菌は、いわば「阿蘇菌」と呼べる一定の抗菌スペクトルを持つ特定の菌種であった。これら阿蘇菌は、阿蘇の草原の植物や栽培作物と「共生」する中で繁栄し特有の生態的地位を占めるようになったと考えられる。

01-13

The oil-eating gangs: Metagenomics revealed the multi-species oil hydrocarbon-degrading soil bacterial consortium evolved in the lab-scale enrichment

○Jiro F. Mori, Yuna Tomiyama, Robert A. Kanaly

Grad. Sch. of Nanobiosciences, Yokohama City Univ.

E-mail: morij@yokohama-cu.ac.jp

Oil spills are recognized as a global environmental pollution issue, because many of the hydrocarbon oil components such as alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) exhibit acute toxicity and genotoxicity to the surrounding organisms. Oil-degrading microorganisms have thus been attracting interest as potentially efficient players for bioremediation of polluted sites. Former studies proposed certain bacterial genera as potential oil-degraders, however a single bacterial group may only be able to biodegrade a fraction of the complex oil components. More likely, the collaborative activities of several key bacterial players are necessary to eliminate the various oil components. Here, we have investigated an oil-degrading soil bacterial enrichment, which has been maintained for years with a constant supply of diesel fuel as the sole carbon and energy source. We employed this bacterial consortium as a simplified model to investigate the active oil-degrading soil bacterial community and to identify the key oil-degrading bacteria and the roles of each bacterial member. In this capacity, a metagenomics functional gene survey of the consortium to study the potential roles of each bacterial genus growing in the consortium was conducted (e.g., alkane-, PAH-degradation, biosurfactant production, biofilm formation, etc.). Some bacterial genera were isolated in pure culture and their growth / biodegradation capabilities were further tested. Results indicated that the consortium harbors more than 50 bacterial genera and the dominant six genera potentially play the central roles in alkane- or PAH-degradation, or both. These results suggest that the biodegradation of complex oil hydrocarbons requires multi oil-degrading bacterial groups, and provides new insight into how the soil bacterial community develops in response to continuous oil pollution exposure.

01-14

ベシクル分化に異常を示す窒素固定放線菌 *Frankia casuarinae* の変異株

○飛鳥井 滉也¹, 松山 伸太郎¹, 中條 将希², Louis Tisa³, 九町 健一¹

¹鹿児島大・院理工, ²鹿児島大・理, ³Dept. of Mol., Cellular and Biomed. Sci., New Hampshire Univ.

E-mail: asukairigaku@gmail.com

窒素固定とは大気中の窒素ガスをアンモニアへと還元する反応のことであり、窒素養分の供給源として必要不可欠な役割を果たしている。*Frankia*は窒素固定を行うことのできる多細胞の放線菌である。アンモニア欠乏 (N-)・好気 (O+) 条件下では、窒素固定酵素 (ニトロゲナーゼ) を発現する球状の構造体 (ベシクル) を形成する。ベシクルはホパノイド脂質の厚い膜で覆われている。ベシクル膜は内部への酸素透過を制限することで、酸素に弱いニトロゲナーゼが失活することを防いでいる。N-・嫌気 (O-) 条件下では、ベシクルは形成されず、菌糸で窒素固定が行われる。これまで、*Frankia*におけるベシクル分化を制御する遺伝子は見つかっていない。

私たちの研究室では、N-・O+条件でほとんどベシクルを形成できず、アセチレン還元活性 (ARA) を示さない変異株 G23D3 を単離した。本研究では、変異株 G23D3 におけるベシクルの表現型をより詳細に特徴づけ、変異原因遺伝子の特定を試みた。

変異株 G23D3 のベシクルの大きさは野生株 WT の約 60% 程度であった。さらに、位相差顕微鏡で観察すると、WT と比べて、ベシクルの位相が非常に暗かったことから、変異株 G23D3 はベシクル膜を十分に形成できないと考えられた。これらの結果から、G23D3 はベシクル原基の発生からベシクル成熟に異常を持つ変異株であると考えられた。加えて、N-・O- 条件下での ARA を評価することで、ベシクル分化またはアンモニア欠乏の感知のどちらに異常があるかを調べた。

異常表現型に関与する変異原因遺伝子を決定するために、変異株 G23D3 由来の復帰変異株 (G23D3r1, G23D3r2, G23D3r3) を単離した。窒素固定能を評価するために、N-・O+ 条件下における、増殖速度と ARA を調査した。すべての復帰変異株は、野生株と同等の増殖と ARA を示した。また、すべての復帰変異株が形成したベシクル数は野生株と同程度であり、形成されたベシクルは野生株と同程度の大きさで位相の明るさであった。これらの結果から、すべての復帰変異株の表現型は野生型に復帰していると考えられた。

変異原因遺伝子を同定するために、変異株 G23D3 と復帰変異集団のゲノム解析を行った。変異株 G23D3 では変異型、復帰変異集団では野生型を示す塩基を含む遺伝子が変異原因遺伝子だと考えられる。

01-15

共生・非共生状態での窒素固定能に異常を示す放線菌 *Frankia* の変異体

○九町 健一¹, 飛鳥井 滉也¹, Van Nguyen¹, Louis Tisa²

¹鹿児島大院・理工, ²Univ. New Hampshire

E-mail: k9928078@kadai.jp

Frankia は、窒素固定能を持つ多細胞放線菌である。アクチノリザル植物と呼ばれる 8 科 200 種以上の非マメ科植物の根に根粒を着生して共生し、その内部で窒素固定を行う。加えて、非共生状態においても窒素固定能を示す。*Frankia* は、ベシクルと呼ばれる球状の酸素耐性構造体を分化することにより、好気条件でも窒素固定を行うことができる。このようなユニークな形質に関わる遺伝子を同定するために、私たちは *Frankia casuarinae* において窒素固定が行えない突然変異体を単離した。そのひとつである N3H4 株は、非共生状態においてベシクル形成は正常に行えるものの、アンモニア欠乏 (N-) 培地で生育せずに窒素固定活性 (アセチレン還元活性) も示さなかった。加えて、宿主植物 *Casuarina glauca* の根に接種しても根粒形成を行わなかった。これらの結果から、N3H4 変異株は共生・非共生双方の窒素固定に重要な遺伝子に変異を持つと考えられた。この多面的な表現型を引き起こす変異原因遺伝子を同定するために、N- 固体培地上で生育するコロニーを単離した。これらの株は、非共生状態のみならず、共生状態においても窒素固定能を回復していた。よって、変異原因遺伝子は、非共生および共生状態での窒素固定能を支配していると考えられた。N3H4 変異株と 5 つの回復株のゲノム配列を解析した結果、変異株と回復株は両方とも NAD⁺ 合成酵素遺伝子に変異を持っていた (C1751T, T584I)。加えて回復株は同じ遺伝子にもう 1 つ変異を持っていた (G1432A, D478N)。この結果から、第 1 の変異が NAD⁺ 合成酵素の活性を損なう原因変異であり、第 2 の変異はその影響を抑制するサプレッサー変異であると予想された。この予想を確かめるために、細胞内の NAD(H) 濃度や、NAD⁺ 合成酵素活性の測定を行った。

01-16

難培養性微生物*Nitrospira*に共存する従属栄養細菌による 増殖促進メカニズムの解明

○村上 千穂^{1,2,3}, 金田一 智規², 町田 光史⁴, 中尾 洋一⁴, 大橋 晶良², 青井 議輝³

¹安田大・薬, ²広島大・院工, ³広島大・院統合生命, ⁴早大・先進理工

E-mail: murakami-ch@yasuda-u.ac.jp

環境中の多くの微生物は難培養性であることが知られている。その事実は微生物学において本質的に重要な課題であるにもかかわらず、なぜそれらが培養できないのか、つまり難培養性という性質についての本質的な理解は全く得られていない。一方で、門レベルで難培養性を示す*Nitrospira*は、亜硝酸酸化反応を主に担う重要な微生物種であるにも関わらず、分離に成功した例は極めて少ないが、我々は新規な手法を適用することで、*Nitrospira*の純粋菌株を獲得している。本研究では、難培養性微生物*Nitrospira*をモデルとして用いて、難培養性微生物の増殖を制御する因子やメカニズムについて、微生物間相互作用の観点から解明することを目的とした。

化学独立栄養細菌である*Nitrospira*は実際の環境中では自身の代謝副産物である有機物を基質として増殖する従属栄養細菌と共存しており、それらの従属栄養細菌の増殖は完全に*Nitrospira*に依存している。しかし、独立栄養細菌 (*Nitrospira*) 側がそれら共存する従属栄養細菌から何らかの利益を享受しているか否かについてはよく分かっていない。そこで、*Nitrospira*と共存する従属栄養細菌を複数菌株単離し、*Nitrospira*との共培養を通じて亜硝酸酸化反応を促進する微生物をスクリーニングして、実際に*Nitrospira*の増殖を促進する従属栄養細菌を複数獲得した。この増殖促進メカニズムは、従属栄養細菌が1) *Nitrospira*の増殖を阻害する物質を消費する、または2)*Nitrospira*の増殖を促進する物質を供給するという二つが考えられる。そこで、*Nitrospira* の培養上清と従属栄養細菌の培養上清を質量分析法によって比較解析したところ、複数得られた従属栄養細菌は、阻害物質を除去しているものと増殖促進物質を出すものとに分かれることがわかった。つまり、*Nitrospira*と共存する微生物は、1)と2)の両方の役割を分担して増殖を促進していることが分かった。

01-17

Dynamics of bacterial cell growth impaired by a novel system dedicating cells to horizontal gene transfer

○Ryo Miyazaki

AIST

Integrative and conjugative elements (ICEs) are widespread mobile DNA elements in the prokaryotic world. ICEs are usually retained in a bacterial chromosome, but can be excised and transferred from the donor to other bacterial lineages. Horizontal transmission of ICE_{clc}, a prevalent ICE in proteobacteria, is accomplished by developing specialized transfer competent (tc) cells in the donor population. The tc cells entirely dedicate to the ICE transmission by sacrificing their proliferation. The cell growth impairment is mediated by two specific genes, *parA* and *shi*, on ICE_{clc}, but its mechanistic details and cellular dynamics are still unknown. We here developed fluorescence reporter strains to monitor intracellular behavior of ParA and Shi proteins as well as host cellular proliferation at the single-cell level. Superresolution imaging revealed that ParA colocalized with the host nucleoid while Shi diffused in cytoplasm during the growth impairment. The two proteins directly interacted in vivo, and mutations in the Walker A motif of ParA diminished the inhibitory effect. Quantitative analysis of time-lapse microscopy data revealed that ParA and Shi initially blocked chromosome segregation, leading to a delay in cell division, and, as time elapsed, eventually inhibited cellular elongation. The *parA-shi* locus is highly conserved in other ICEs, and the ParA-Shi-mediated growth inhibition was still observed in different proteobacterial species, suggesting that the system can become selected to efficiently distribute ICEs in a particular niche. The results of our study provide mechanistic insight into the novel and unique system on ICEs and help to understand such epistatic interaction between ICE genes and host physiology that entails efficient horizontal gene transfer.

01-18

高感度 rRNA-SIP と動態解析で探る環境微生物の代謝様式

○青柳 智, 羽部 浩, 堀 知行

産総研・環境管理

E-mail: aoyagi-to@aist.go.jp

【目的】 Stable Isotope Probing (SIP) は環境中の未知微生物の代謝機能と系統を分離培養を介さずに直接的に同定できる。我々が改良した高感度 rRNA-SIP では、同位体標識されて「重くなった」rRNA の塩基配列を次世代シーケンサーにより大規模に解読することで、存在量は少なくとも代謝活性を有する微生物を高感度に検出することが可能となった。本発表では、高感度 rRNA-SIP と微生物動態解析を組み合わせることで示唆される、未知微生物の代謝様式を紹介する。【方法・結果】 1,4-ジオキサンは人への発がん性が指摘されているが、石油化学製品の製造過程で副産物として生成される難分解性物質である。石油化学工場の生物処理槽から取得した活性汚泥試料に、¹³C 標識 1,4-ジオキサンを加えて培養したところ、1,4-ジオキサン濃度の減少と同時に ¹³CO₂ が生成した。その活性汚泥試料から RNA を抽出し、超遠心分離を行った。これにより、¹³C 標識 1,4-ジオキサン由来の ¹³C を含む「重い RNA」がチューブ下部に集積された。「重い RNA」の上位 3 画分を回収し、次世代シーケンサーで合計 100 万配列以上の微生物 rRNA を解析した。¹²C 添加区（対象区）との比較解析により、有意に ¹³C を分解し取り込んだ微生物として、10 種を同定した。このうち 1 種は既知の 1,4-ジオキサン分解菌と系統的に同一であったが、他の 9 種はそれぞれ異なる多様な系統学的位置に属した。実廃水の生物処理槽において、今回同定された分解菌の動態を約 1 年間モニタリングした。その結果、10 種のうち 9 種が検出され、非検出の 1 種の ¹³C 取り込みは偽陽性だったと判断された。また検出された 9 種の分解菌はいずれも低い年間平均相対存在量（0.001 % - 1.523 %）を示し、活性汚泥中で稀少種として存在していた。興味深いことに、最も重い画分から発見された 4 種は、相対存在量が極めて低い傾向があり（平均：0.008%、範囲：0.001%-0.021%）、一方で 3 番目に重い画分で検出された 5 種は、より高い存在量（平均：0.483%、範囲：0.001%-1.523%）を示した。以上から、最も重い画分で同定された分解菌は 1,4-ジオキサンのみを分解し、それで得られる僅かなエネルギーにより生存していること、さらに 3 番目に重い画分の分解菌は処理槽内に共存する他の有機物（アルカン類等）を分解して得られたエネルギーを基に増殖し、1,4-ジオキサンは共代謝的に利用していることが強く示唆された。

01-19

絨毛虫 *Tetrahymena thermophil* の増殖に及ぼす可視光照射と細菌由来二次代謝物の複合的影響

○佐野 翔平¹, 多羅尾 光徳²

¹東京農工大・院農学府, ²東京農工大・農学研究院

【はじめに】我々は本学会第 31 回大会にて、可視光照射が絨毛虫 *Tetrahymena thermophila* の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを試み、以下の 3 点を報告した。(1) 溶存態有機物を生育基質とした場合は光照射によって増殖が抑制された。(2) 培養期間後半で光条件から暗条件に切り替えても増殖抑制が維持された。(3) 細菌を生育基質とした場合は光照射下においても増殖は抑制されなかった。これらの結果より、光照射による原生動物の増殖抑制は、光照射によって変質した培地成分が阻害的な影響を及ぼすことが考えられた。しかし、光照射によって変性成分を生じるメカニズムや、細菌を生育基質としたときには光照射による増殖阻害が生じなかった理由を明らかにするには至らなかった。そこで本研究では、(1) 光照射により生じた活性酸素種が培地の変質をもたらす、(2) 細菌由来二次代謝物が光照射による原生動物の増殖抑制効果を緩和するとの仮説を立て、これらを検証する実験を行った。【材料と方法】1. 活性酸素種の影響 原生動物として絨毛虫 *T. thermophila* を、活性酸素種として過酸化水素を用いた。ペプトン、酵母エキス、グルコースをそれぞれ 300, 150, 150 (単位 mg/L) 含む培地 (PYG 培地) に、過酸化水素 (終濃度約 0.06ppm) またはカタラーゼ (終濃度約 0.02mg/mL) を添加し、絨毛虫を約 1×10^2 cells/mL となるように接種した。明条件 1 (培養期間中に光照射), 明条件 2 (絨毛虫接種前の 6 日間に光照射) または暗条件で 15°C にて培養し、絨毛虫の細胞数を経時的に測定した。2. 細菌由来二次代謝物の影響 (1) PYG 培地, (2) PYG 培地で細菌を定常期まで増殖させた培地 (PYG + E 培地), (3) PYG + E 培地から細菌をろ過滅菌し、濃縮した PYG 培地を上記の濃度になるように再添加した培地 (PYG-E 培地) に、絨毛虫を約 1×10^2 cells/mL となるように接種、明条件または暗条件で培養し、絨毛虫の細胞数を経時的に計数した。【結果と考察】光照射によって培地中に過酸化水素が約 0.06ppm 検出された。暗条件培養系に過酸化水素を添加した場合 *T. thermophila* の増殖は抑制された。一方、明条件培養系にカタラーゼを添加し過酸化水素を除去しても *T. thermophila* の増殖は回復しなかった。これらの結果より、過酸化水素が培地を変質することで原生動物の増殖が抑制されたと考えられる。細菌由来二次代謝物の影響の実験結果および考察については、本大会当日に報告する。

01-20

シアノバクテリアはスパイダーマン？ 糸の伸縮で動く仕組み

○中根 大介, 西坂 崇之
学習院大・理・物理

IV型線毛は多くの原核生物に見られる超分子複合体である。Twitching motilityと呼ばれるバクテリアの表面運動は、IV型線毛からなる繊維構造が伸長・付着・収縮を繰り返すことで、細胞が固体表面上を動く際の推進力を獲得している。IV型線毛のモーターとしての性質は生物物理学的に精査されているが、その制御メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、シアノバクテリアのモデル生物であり、光の向きを『認識』することで知られる *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、単一細胞レベルでのIV型線毛ダイナミクスを詳細に計測した。我々は、光学顕微鏡下で蛍光ビーズを用いて、その動態を検出し、忌避光である青色光刺激によって制御されることを実証した。つまり、細胞が光源から逃げるように、IV型線毛の伸長と収縮は光照射の前方側でのみ活性化されていた。加えて、我々は線毛を蛍光標識で直接可視化することで、このとき線毛が非対称に分布することを定量化した。細胞は青色光を照射されると、0.2分以内に細胞全体にあるIV型線毛を均一に活性化するが、1分後には光受容タンパク質PixDを介して、その活性化を光軸に沿って非対称なものへと変化させ、指向性のある細胞運動を達成する。この一連の過程は、IV型線毛装置だけでなく、アーキアのべん毛や他の分泌装置といった、本質的に共通だと期待されるシステムの制御メカニズムを理解する手掛かりとなるだろう。

01-21

海産珪藻感染性DNAウイルスゲノムに存在する機能不明遺伝子の発現

角野 貴志^{1,2}, 足立 真佐雄¹, ○外丸 裕司²
¹高知大・農林海, ²水産機構 瀬水研

我々の研究グループでは、海洋の重要基礎生産者である珪藻とそれに感染するウイルスの生態学的関係について調査を進めている。珪藻ウイルスは大別してRNAウイルスとDNAウイルスに分けられ、両者の基本的なゲノム性状は既に報告されている。RNAウイルスは複製酵素関連ならびに構造タンパク質と推定される遺伝子を含む約9kbの1本鎖RNAである。一方、DNAウイルスは約5-6kbの環状1本鎖DNAをゲノムとして持ち、比較的長い少なくとも4つのオープンリーディングフレーム (ORF) VP1、VP2、VP3ならびにVP4から構成されている。そのうちVP3は複製関連タンパク質、VP2はカプシドタンパク質と相同性が見られる。ところがVP1ならびにVP4は、既報のタンパク質と相同性が見られず、これらの機能は不明である。本研究では、VP1ならびにVP4の発現の有無を確認する事を目的とし、複数の宿主珪藻と珪藻DNAウイルスの組合せで感染実験を行った。そして各ORFの経時的な発現をRT-PCRにより解析した。その結果、VP1とVP4がVP2とVP3よりも早い段階で発現していることが明らかとなった。VP1のアミノ酸配列には、11残基からなる保存領域が確認された。一方、VP4のアミノ酸配列には相同性が見られなかったが、サイレンシング抑制因子より見出されたアミノ酸配列が見られ、上流の塩基配列においても共通配列が見つかった。これらのことから、VP1とVP4の機能並びに発現機構は、珪藻DNAウイルスの種間で共通であると推察された。本研究の一部は科研費 (16H06429, 16K21723, 16H06437, 19H00956) によって行われた。

01-22

巨大ウイルスの分布の局所性について ～日本の巨大ウイルス分離例から～

○武村 政春^{1,2}, 明石 基洋¹, 青木 啓太², 高橋 春菜², 佐々木 健太³, 小林 実桜¹, 深谷 将²

¹東京理科大・理, ²東京理科大・院理, ³東京理科大・理工

E-mail: takemura@rs.kagu.tus.ac.jp

【背景・目的】巨大ウイルスとは、一般的に粒子径が200 nm以上、ゲノムサイズが30万塩基対を超える大型DNAウイルスのうち、2003年以降、主に単細胞真核生物に感染するウイルスとして分離されてきたウイルスを指す。現在までに、ミミウイルス科、マルセイユウイルス科のほか、パンドラウイルス、ピソウイルス、モリウイルス、メドゥーサウイルスなど多くのウイルスが新しく分離されてきた。巨大ウイルスの局所的な分布のありよう、多様性については、メタゲノミクスを用いた研究はあるものの、分離ウイルスを用いた生物学的研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、日本の各地から巨大ウイルスを分離し、そのサンプリング場所の共通性や分離ウイルスの多様性から、巨大ウイルスの局所的な生態の一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】日本の様々な水環境（汽水・淡水・土壌）から50 mLチューブ1本に収まる程度の水もしくは含水土壌サンプルを採取し、そのうち数 mL程度をP2実験室内で96ウェルプレートにて培養したアカントアメーバ (*Acanthamoeba castellanii* Neff株) に抗生物質と共に添加し、数日間培養した。アカントアメーバが丸くなるなどの細胞変性効果を起こしたウェルの上清を植え継ぐと共に、各種巨大ウイルス用プライマーを用いたPCR、または細胞変性効果を起こしたアカントアメーバの透過型電子顕微鏡観察により、巨大ウイルスの存在を確認し、その種の同定を行った。

【結果・考察】東京都内・荒川の水際の土壌ならびに水からサンプリングした数 mLからミミウイルス1株ならびにマルセイユウイルス2株を、新潟県柏崎市の溜池ならびに河口の汽水域からサンプリングした数 mLから新たなマルセイユウイルス2種8株 (*kashiwazakivirus*, *hokutovirus*) を、そして埼玉県農業用水からサンプリングした数 mLから複数の巨大ウイルス株（現時点では未同定）を、それぞれ分離することに成功した。このことから、数 mLの水あるいは土壌サンプルから複数の巨大ウイルスを分離することが容易であること、また多様な巨大ウイルスが極めて狭い範囲内に生息し、独自の生態系を構築していることが示唆された。今後は、分離した各巨大ウイルスの詳細なゲノム科学的・生態学的研究を推進すると共に、自然宿主の同定を進めていく予定である。

01-23

未分離の海洋性 *Bacteroidetes* 門細菌感染ウイルスの生物情報学的探索

○富永 賢人¹, 緒方 博之², 吉田 天士¹

¹京大・院農, ²京大・化研

E-mail: tominaga.kento.33x@st.kyoto-u.ac.jp

【目的】海洋の微生物ウイルスは、感染による宿主の代謝制御・溶菌を通じ、宿主動態や多様性、さらに海洋物質循環に影響を与える。しかし、宿主微生物の分離の困難さが、海洋ウイルス生態学の律速である。海洋に広く優占する *Bacteroidetes* 門細菌も主要系統が未分離で、そのウイルスの知見が不足している。本研究は、本門に感染するウイルスの多様性の理解を目指し、生物情報学的手法によりメタゲノムから新規本門細菌ウイルスを探索した。

【方法】先行研究で海洋メタゲノムより構築された未分離の完全長1,811ウイルスゲノムを解析に用いた。宿主の参照配列は公共データベースの本門細菌3,695ゲノムと海洋メタゲノム由来の本門細菌518ゲノム(以降、MAGと略記)を用いた。まず、(1) 宿主CRISPRスペーサー領域、(2) tRNA相同性、(3) 塩基配列相同性、(4) オリゴヌクレオチド頻度距離の既存4指標に基づき宿主予測を行った。次に、ウイルスゲノム上の宿主ホモログの割合に基づく新規予測手法の確立を試みた。分離培養系が確立された53本門ウイルスと100種の他系統の原核生物のウイルスについて、本門細菌のホモログが占める割合を算出・比較し、閾値を設定した。その閾値を上回るゲノムを新規本門ウイルスとして抽出した。

【結果】既存の指標では、分離株・メタゲノム由来の宿主ゲノムを参照して、それぞれ7ゲノム、27ゲノムが本門ウイルスに予測された。未分離ウイルスの宿主予測には、MAGがより有効だった。また、ウイルスの全遺伝子に占める本門細菌ホモログの割合は、分離された既知本門ウイルスにおいて高く(平均36%)、他系統を宿主とする原核生物ウイルスでは、最大でも8%であった(平均1%)。8%を閾値とし、327ゲノムを本門ウイルスとして抽出した。手法間での重複を除いた新規本門ウイルス計339ゲノムは、ゲノム類似度に基づき96属に分類された。このうち、275ゲノムはプロテオミクツリー上で既知本門ウイルスの近傍に位置した。64ゲノムは、ほぼ全てが海洋未分離ウイルスからなる19系統に分類され、水圏に普遍的に生息するが宿主不明のFar-T4ウイルス系統などが含まれた。本研究により、既知の本門ウイルス分離株とは系統的に異なる多様な海洋本門ウイルスの存在が明らかになった。

01-24

シアノウイルス—宿主相互作用解明に向けた海洋シアノバクテリアの高純度分手法の確立

○磯崎 達大¹, 富永 賢人¹, 山本 圭吾², 左子 芳彦¹, 緒方 博之³, 吉田 天士¹

¹京都大・院農, ²大阪環農水総研, ³京都大化研

E-mail: isozaki.tatsuhiko.86w@st.kyoto-u.ac.jp

【目的】海洋シアノバクテリアは海洋一次生産の25%を担い、海洋物質循環の起点となる。先行研究において、大阪湾では本門シネコッカス属の4つの種内個体群が毎年優占した。一方、シアノウイルスは年ごとに優占系統の組成が変化した。そこで、シアノバクテリアとシアノウイルスの相互作用を詳しく理解するため、環境からシアノバクテリアを選択的に少数分取するミニメタゲノム解析により、感染細胞および細胞内ウイルスのゲノム情報を明らかにすることを目的としている。これに先駆け本研究では、環境試料からのシアノバクテリアの選択的分取法を確立した。

【方法】大阪湾湾口部で、2018年10月30日の13時と18時に採水し、 ϕ 3.0 μ mフィルターで真核生物を除去した。 ϕ 0.2 μ mフィルターに原核微生物を捕集し、ろ液をウイルス画分とした。原核微生物画分からクロロフィルの650 nmの自家蛍光を有する集団をセルソーターにより10万細胞を分取し、蛍光顕微鏡観察と16S rRNA アンプリコン解析に供した。ウイルス画分からDNAを抽出し、ウイルスメタゲノム (ビローム) 解析へ供した。【結果】13時と18時に採取した海水の原核微生物画分では自家蛍光を有する細胞がそれぞれ17%と31%であった。また、16Sアンプリコン解析の結果、13時と18時それぞれでシアノバクテリア OTUs は全配列の10%(30 OTUs)と25%(52 OTUs)を占めた。これらのシアノバクテリアは先行研究の大阪湾の種内個体群4つが優占した。次に、これらのシアノバクテリアに相互作用し得るシアノウイルスを抽出した。ビローム解析で得た10 kb以上の697コンティグのうち、3属14コンティグが既知シアノウイルスと高いゲノム類似度を示し、全配列の約4%を占めた。ポドウイルス科は先行研究と同一の2コンティグが優占する一方、過去の大阪湾のミオウイルス科の6コンティグと異なるコンティグが優占した。次に、シアノバクテリアのミニメタゲノム解析構築のために、シアノバクテリアの選択的分取法の最適化を行った。環境試料をセルソーターに供し、クロロフィルの自家蛍光が高く、細胞が小さい集団を分取したところ、13時と18時それぞれで95%と84%に自家蛍光が観察された。分取した試料のアンプリコン解析で得たシアノバクテリア OTUs は96%(28 OTUs)と90%(54 OTUs)を占め、その組成は環境試料中と同じであり、4つの種内個体群で90%以上を占めた。従って、環境試料からシアノバクテリアを高純度に分取できた。

01-25

新規 marseillevirus 感染 acanthamoeba の細胞凝集体形成メカニズムの解析

○青木 啓太¹, 深谷 将¹, 小林 実桜², 明石 基洋², 武村 政春^{1,2}

¹東京理科大・院理, ²東京理科大・理

E-mail: 1718501@ed.tus.ac.jp

Marseilleviridae は2009年に marseillevirus が発見されて以降、世界各地から13種類以上のウイルスが分離されている。我々は2018年に新潟県内の河川ならびに池から採取した水サンプルを用いてスクリーニングを行い、major capsid protein (MCP) 遺伝子ならびに D5-like helicase-primase 遺伝子による分子系統解析の結果、新規 marseillevirus である hokutovirus、kashiwazakivirus の2種8株を分離することに成功した。光学顕微鏡によるウイルス感染 acanthamoeba 細胞の観察の結果、hokuto-, kashiwazakivirus 感染 acanthamoeba 細胞では、細胞同士が寄り集まった細胞凝集体 (bunch) を形成することが明らかとなった (Aoki et al., 2019)。この現象はこれまでに分離された marseillevirus では確認されておらず、これら新規 marseillevirus に特有の性質であることが示唆されている。そこで本研究では、hokutovirus 感染アメーバによる bunch 形成メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

Hokutovirus 感染アメーバ細胞における bunch 形成過程を当研究室で開発中の細胞動態プログラムを用いて詳細に解析を行った。これまで *Mimiviridae* の一種である tupanvirus において bunch 形成が認められ、それに tupanvirus 由来 mannose binding protein が関わっていることが示唆されている (Abraham et al., 2018)。そこで、hokutovirus 感染 acanthamoeba における bunch 形成に関わる分子の同定を目指し、単糖である galactose、mannose、glucose、さらに二糖である lactose を添加することで bunch 形成が阻害されるか検討した。

タイムラプス撮影画像を用いた細胞動態解析における acanthamoeba 細胞数、bunch の平均サイズと最大多重度の経時的変化より、galactose を添加した acanthamoeba でのみ、hokutovirus 感染後の bunch 形成が遅延することが確認され、mannose、glucose を添加した場合には bunch 形成時期に変化は見られなかった。このことから、hokutovirus 感染 acanthamoeba の bunch 形成は tupanvirus の場合とは異なり、acanthamoeba の細胞膜における galactose 認識の変化によって生じるものであることが示唆された。

01-26

A persistent algal virus with an unprecedented amount of metabolic genes

○Romain Blanc-Mathieu^{1,2}, Hakon Dahle², Hiroyuki Ogata¹, Ruth-Anne Sandaa²

¹Bioninf. Center, Kyoto Univ., ²Dept. Bio. Sc., Bergen Univ.

E-mail: roblanc@kuicr.kyoto-u.ac.jp

Most isolated eukaryotic microalgal viruses have a narrow host range, are rather acute and can be involved in bloom termination. These viral traits may not be representative of the majority of viruses in nature. Pymnesium kappa virus RF01 (PkV RF01) is a recently isolated giant virus able to infect species in two different genera of the order Pymnesiales (Haptophyta), at a relatively slow replication rate compared to other algal viruses (Johannessen et al. 2015 Virology). We obtained and explored the genome sequence of PkV RF01 to uncover genomic clues associated with its peculiar phenotype. Phylogenetic analyses of nucleocytoplasmic large DNA viruses' core genes confirmed that PkV RF01 branches deep in the Mimiviridae clade. Its 1.4 million base pairs-long linear genome, the largest for a virus infecting photosynthetic organisms, possesses several genes predicted to code for enzymes involved in the metabolism of sugars, lipids and in energy production. It is predicted to code for a succinate dehydrogenase complex, an enzyme involved in the Krebs cycle and in oxidative phosphorylation. This protein-complex, never observed in a virus before, is transcriptionally active during infection and found to be encoded in the genome fragments of Mimivirus relatives in marine metagenomes, suggesting that it is functional and not anecdotal. Two aminoacyl tRNA synthetases present in PkV RF01 and in most other Mimiviridae viruses branched together at the root of the eukaryotic tree of life supporting the ancient evolutionary history of these viruses. This study identifies PkV RF01 as a promising model virus to uncover new aspects of marine viral ecology (compared to commonly isolated algal viruses).

01-27

糸状菌を用いた RNA ウイルス多様性の再検証

千葉 悠斗¹, ○浦山 俊一^{2,3}, 矢口 貴志⁴, 萩原 大祐^{2,3,4}

¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター,

⁴千葉大・真菌医学研究センター

E-mail: s1821124@s.tsukuba.ac.jp

ウイルスは健全な生物にも高頻度に潜在している、ありふれた存在であることが明らかになりつつある。この普遍性はNGS技術の登場により明らかになったものであるが、真菌や植物においては、NGS登場以前から同様のことが知られていた。これは病徴を示す生物以外からウイルスを見出すために必要不可欠な、分子マーカーが利用できたことによる。具体的には、RNAウイルス感染の分子マーカーとしてdsRNAが用いられてきた。さらに近年では、真菌や植物においてもRNA-seqが利用されるようになり、これら生物群におけるRNAウイルスの多様性理解は他生物に比べて進んでいる。しかし、従来用いられてきたdsRNAの検出は電気泳動に基づくため感度が悪いことや、NGSデータからのウイルス遺伝子探索は相同検索に基づくため新規性の高いウイルス遺伝子は検出できないことから、これら手法にはRNAウイルスの見逃しが生じる可能性がある。そこで本研究では、ウイルスの網羅的探索が最も進んでいる生物の一つである糸状菌を用い、上記のような課題がどの程度の見逃しを生む可能性があるのかを明らかにするため、上記課題を克服可能なFLDS法を用いたRNAウイルス探索を行った。野外または患者から単離された糸状菌*Aspergillus fumigatus*およびその近縁種156株中、17株から少なくとも1種のRNAウイルスが検出された。このうち8株からはdsRNAバンドが検出されず、そこから見いだされたウイルスは全てssRNAをゲノムとするウイルスであった。この結果は、dsRNAの電気泳動によるスクリーニングでは見落とされてしまうウイルスが存在し、特にssRNAウイルスが過小評価されている可能性が高いことを示唆している。また、*A. fumigatus*から既に報告のあるウイルスとほぼ同一のウイルスでありながら、当該報告には記載のない分節ゲノムを保持すると考えられるウイルスも複数見出した。これら記載のない分節ゲノムは相同性解析で既知ウイルスと十分な類似性を示さなかったことから、RNA-seqデータから抽出できず、見逃された可能性がある。これらの結果は、RNAウイルスの多様性理解が最も進んでいる糸状菌においても、現在広く用いられている手法では相当数の見逃しが存在しており、現在の想定以上に糸状菌のRNAウイルス多様性は高いことを示唆している。

02-01

パン酵母と肥料を使った環境調和型地盤改良技術の開発

○谷口 恵梨, 中村 孝道, 遠藤 正美

熊谷組・技研

《背景》微生物機能による鉱物化反応（バイオミネラリゼーション）を利用した地盤改良技術は、ここ 10 年の間に大学・研究機関を中心に研究開発が進められており、CO₂排出量削減、地下水および周辺地盤環境の保全、コスト低減などのメリットがあげられ、環境調和型施工技術の開発に繋がると考えられる（川崎, 2015）。前回大会において、入手及び取扱いが容易であるドライイーストと市販肥料を用いることで、砂地盤の土壌固化が可能であることを示した（中村, 2018）。しかし、強度発現に日数を要すること及び砂地盤以外の地盤における土壌固化は確認できておらず、適用範囲や用途に難があると考えられた。

《目的》様々な土壌への地盤改良工法あるいは簡易舗装法への適用範囲拡大を想定し、より安価で簡易かつ既存の技術と同程度の強度発現を目指した微生物利用土壌固化実験を実施した。

《方法》固化対象は、山砂及び粘性土とした。pH調整剤及び2価金属イオン供給源として、市販の農業用肥料、未焼成貝殻資源を使用した。微生物はドライイースト（パン酵母）を使用した。純水を混合し予備発酵させたドライイーストあるいはYPD培地で培養したイーストを酵母液とした。これらを混合・添加したものを供試体とした。恒温恒湿室（30℃/60%）もしくは室温の嫌気チャンバーにて1週間養生し、経時的に簡易土壌硬度計、土壌pH計、カルシウムイオンメータ、蛍光顕微鏡を用いて測定を行った。

《結果》貝殻資源の配合により、砂のみならず粘性土も固化することができた。従来法における強度発現には5～7日以上以上の養生が必要であったが、貝殻資源配合により強度発現を1～2日短縮することができた。微生物機能を利用した土壌固化技術においてより早期の強度発現を促すためには、固化対象土に粉碎された貝殻資源を配合すること、また添加する酵母液はイーストの活性を高めることが有効であった。貝殻資源を配合することは、固化対象土壌の拡大にも寄与すると考えられ、環境調和型地盤改良技術の対象土壌の広範囲化や用途拡大が見込まれる。しかしながら、地中深くを想定した嫌気条件下においては固化が確認できず、固化対象土の深さには限度があると考えられる。

川崎了, Journal of MMIJ. 131, 155-163(2015).

中村ら, 日本微生物生態学会第32回大会(2018).

02-02

電子受容体投与による油汚染土壌嫌気処理効率化の試み

○河村 大樹, 眞鍋 磨弥, 中村 孝道

株式会社熊谷組

E-mail: daiki.kawamura@ku.kumagaigumi.co.jp

背景：油含有土壌のバイオレメディエーションにおいて嫌气的処理が促進されると、原位置の嫌気環境および好気反応後に形成される嫌气的環境をそのまま浄化反応場として利用することができ、好气的処理と比較して省力化やコストの削減に期待できる。嫌気条件下での油分解においては、油を電子供与体と想定し、電子受容体（Fe, Mnなど）の還元反応により分解が進むと考えられる。

目的：本研究では、嫌气的処理の高効率化を図る目的で、油含有土壌の嫌气的処理において、電子受容体の違いが油分濃度の低減に与える影響と微生物群集との関係性を室内試験によって調査した。

方法：山砂に対してタービンオイルを重量比0.5%で混ぜ合わせた模擬油汚染土壌を作成し、それに4つの実験条件を与えた。条件1では、当該油含有土壌30gに対して牛糞堆肥を3g添加した。条件2では、条件1に対して重量比で0.5%の硝酸カリウムと0.125%の溶成燐肥を添加し、硝酸イオンを電子受容体とした。条件3は、条件2にさらに0.5%のクエン酸鉄を添加し、三価の鉄イオンを電子受容体とした。条件4は、条件2にさらに0.5%の硫酸アンモニウムを添加し、硫酸イオンを電子受容体とした。各条件における供試体はそれぞれバイアル瓶（200 ml容）に入れて密閉しそれを4本ずつ作成した。窒素ガスで気相置換のうえ、恒温槽（30℃）で静置、0, 3, 6, 12週目に油分濃度分析とNGS解析を行った。

結果：4条件の油分（TPH）残存率を比較すると、条件1>条件3≒条件4>条件2となった。電子受容体の添加により油分分解が促進することが分かった。なかでも、硝酸還元反応が最も油分分解効果が高かった。NGS解析では、条件2で、ほかの実験条件と比べ、微生物群集が多様性に富んでいることが分かった。これは様々な微生物種が活動的になったものと考えられる。TPH残存率は条件2で最も低くなっている。すなわち、土壌のC/N比が整ったことで微生物が活性化し、油分分解が進行したと考えられることがNGS解析から推測される。本研究では、酸化還元電位に則した電子受容体の投与が油分分解に有効である可能性があることと多様な細菌の活動が油分分解につながることを実験的検討により明らかにした。今後は、各電子受容体の適切な投入時期あるいは異なる電子受容体の段階的投与の検討と各実験系におけるDNA解析を行い、嫌気処理の効率化を目指す。

02-03

モエジマシダとヒ素可溶化微生物群を複合的に用いた新規土壌浄化法

○柏原 湧太¹, 天知 誠吾¹, 宮内 啓介³, 黄 毅⁴, 山村 茂樹²

¹千葉大・院園芸, ²国環研, ³東北学院大・院工, ⁴東北大・院環境科学

E-mail: afca1064@chiba-u.jp

我が国の土壌汚染対策法では、ヒ素濃度の基準値が 150 mg kg⁻¹と定められている。現在、基準値を超過した土壌は、主に掘削除去など物理化学的手法で処理されているが、高コストのため新たな処理法が求められている。環境中でヒ素は、主にヒ酸 [As(V)] と亜ヒ酸 [As(III)] として存在するが、酸化環境では As(V) が優占し、鉄やアルミニウム(水)酸化物等に吸着している。一方、還元環境では、ある種の微生物が As(V) を異化的に還元するため、吸着性の低い As(III) として土壌中から溶出する。この微生物学的プロセスを応用することで、汚染土壌からヒ素を可溶化することが原理的に可能であるが、溶出したヒ素の効率的な回収技術が必要となる。一方、モエジマシダ (*Pteris vittata*) はヒ素を高濃度で蓄積することで知られ、ファイトレメディエーションへの応用が期待されている。そこで本研究では、微生物によるヒ素可溶化と、モエジマシダによるヒ素吸収・蓄積を組み合わせた新規土壌浄化法の確立を目的として、ラボスケールでの検討を行った。ヒ素汚染土壌 (240 mg-As kg⁻¹) 200 g を入れたプラスチック容器に 4 L の水を添加し、発泡スチロールでモエジマシダ 4 株を浮かせた。LED バールライトで光源を確保し、室温は 25℃ に設定した。ヒ素可溶化微生物群の炭素源として乳酸 900 mg L⁻¹ を 10 日毎に添加した系 (L)、乳酸と共に酸化還元メディエーターとしてリボフラビンを 50 μM 添加した系 (LR)、及び無添加系 (N) の 3 条件で実験を行った。モエジマシダを植栽しない対照系も調製した。液相のサンプリングを経時的に行い、ヒ素濃度を ICP-AES で測定した。90 日後に土壌及びモエジマシダを回収し、残存及び蓄積したヒ素を抽出・測定した。実験開始 25 日目に、L 及び LR ではそれぞれ 4.1 mg L⁻¹ 及び 3.2 mg L⁻¹ のヒ素が液相中に溶出した。その後、モエジマシダ存在下ではヒ素濃度が徐々に減少したが、モエジマシダを植栽しない対照系では減少が確認されなかった。一方、炭素源を添加しない N では、実験期間を通して有意なヒ素の溶出が認められなかった。このことから、乳酸添加によって効率的にヒ素を可溶化できることが確認された。実験終了後、L、LR 及び N で土壌中の残留ヒ素濃度がそれぞれ 65 mg kg⁻¹、67 mg kg⁻¹、及び 117 mg kg⁻¹ まで低下し、いずれの系でも土壌汚染対策法の基準値を下回った。以上の結果より、本法により効率的にヒ素汚染土壌の浄化が行える可能性が示唆された。

02-04

嫌気性地下水に含まれる水素発生型発酵細菌を利用した水素ガス生成システムの構築

○津布久 卓也¹, 木村 浩之²

¹静岡大・院理・地球, ²静岡大・理・地球

E-mail: tsubuku.takuya.14@shizuoka.ac.jp

水素ガスは燃焼させても二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーと言われている。水素ガス貯蔵技術の向上に伴う燃料電池車の普及により、近年、水素ガスの需要は増加している。需要を賄うための水素ガスの供給は、天然ガス(メタン)の水蒸気改質、鉄鋼生成等の工場の副産物、水の電気分解等の方法が知られている。しかし、これらの水素ガス生成方法のみでは将来的な水素ガスの需要を満たせないため、より低コストで高効率な水素ガス生成システムの構築が求められている。

そこで、深部帯水層に由来する嫌気性の地下水に含まれる水素発生型発酵細菌に着目した。水素発生型発酵細菌は有機基質から水素ガスと二酸化炭素を生成するバクテリアで、嫌気性の深部帯水層では水素資化性メタン生成菌と共生して、メタンを生成する。本研究では、水素資化性メタン生成菌を特異的に阻害し、水素発生型発酵細菌のみを増殖させることで水素ガスを生成するバイオリアクターの開発を試みた。

大深度掘削井を介して深部帯水層に由来する地下水を採取した。最終濃度が 0.22% となるように有機基質を添加した。地上部での温水に近い温度で保温し、水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌を共生させることにより、メタンを生成するバイオリアクターを開発した。一方、メタン生成リアクターと比べて 10℃ 高い温度で保温して、メタン生成菌を特異的に阻害し、水素発生型発酵細菌を増殖させて水素ガスを生成するバイオリアクターを開発した。培養中、H₂, CO₂, CH₄ の生成量を測定した。一連の研究結果より、水素ガス生成リアクターにおいて水素ガスと二酸化炭素を検出した。培養開始から 2-5 日で水素ガスは検出され、培養中の水素ガス最大生成速度は 4.15-6.17 mmol L⁻¹ day⁻¹ だった。16S rRNA 遺伝子を対象とした遺伝子解析の結果、水素ガス生成リアクターでは水素発生型発酵細菌を含む *Clostridiales* 目、*Thermales* 目の増殖を確認した。また、メタン生成リアクターと水素ガス生成リアクターの微生物相を比較したところ、水素ガス生成リアクターにはメタン生成菌を含むアーキアが検出されず、メタン生成リアクターには *Methanobacteriales* 目などのメタン生成菌が検出された。本研究により、メタン生成リアクターと比べて 10℃ 高い温度で培養することで、水素資化性メタン生成菌を特異的に阻害し、水素発生型発酵細菌のみを増殖させる水素ガス生成が可能であることが実証できた。

02-05

硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II の酢酸酸化型電極呼吸の解析○工藤 優輝¹, 大前 貴裕², 安池 一貴¹, 田代 陽介¹, 二又 裕之^{1,3,4}¹静大院・総科技, ²静大・工, ³静大創造大学院, ⁴静大・グリーン研

E-mail: kudo.yuki.14@shizuoka.ac.jp

細胞外電子伝達機構 (Extracellular electron transfer:EET) とは、微生物がミネラルなどの細胞外の物質を電子受容体として利用する呼吸形態である。このような生物学的能力は土壌や深海海底土圏といった嫌気環境におけるエネルギー獲得手段として発揮されており、微生物生態系そして生物地球化学的物質循環において重要な役割を果たしている。これまで当研究室では、汽水湖底泥を接種源とした微生物燃料電池の負極バイオフィームから分離した *Desulfovibrio* sp. HK-II が EET を行うことを見出した。本株は興味深いことに、硫酸還元条件下では乳酸を酢酸に当量変換する不完全酸化型代謝を示す一方で、電子供与体を乳酸、受容体を電極とした電極呼吸条件下では電流生産に伴い乳酸および生成した酢酸が減少した。更に、酢酸を電子供与体とした場合においても電極呼吸を行ったことから、本株は完全酸化型代謝へと代謝メカニズムを切り替えることが明らかとなっている。*Desulfovibrio* 属細菌が行う EET に関する知見はほとんどなく、このような新規性の高い本属細菌 EET 機構の解明は生態学的に非常に興味深く、また微生物燃料電池への応用の観点からも重要である。本研究では生理学および電気化学的解析により HK-II 株の EET 機構に関する新たな知見を得たので報告する。

これまでに、硫酸還元細菌は TCA サイクルあるいは Wood-Ljungdahl (WL) 経路を介して酢酸代謝を行うことが報告されている。そこで、HK-II 株のゲノム情報をもとに本経路を有するかを推定したところ、WL 経路に関わる全ての推定遺伝子が確認された一方で TCA サイクルに関わる 4 つの推定遺伝子が確認されなかった。WL 経路を介した完全酸化型代謝を行うことが推測されたため、その鍵となる酵素である CO dehydrogenase 遺伝子 (*cooS*) について転写量解析を行ったところ、酢酸を電子供与体とした電極呼吸時に転写は確認されず、WL 経路の関与は認められなかった。続いて、HK-II 株は間接型 EET を行うことが推察されているため、レドックス物質生産能力を評価したところ、硫酸呼吸時にピーク電位 -245mV を示すレドックス物質を生産することが明らかとなった。また、培養液のピーク電位は上清と比較して 60mV 正電位方向にシフトすることが確認され、HK-II 株細胞との相互作用が示唆された。HK-II 株の完全酸化型代謝経路の推定および硫酸呼吸時に生成されるレドックス物質と EET の関連性について、現在解析中である。

02-06

細菌のヨウ素酸呼吸には新規鉄硫黄モリブデンタンパク Idr が関与する

○天知 誠吾¹, 山崎 千尋¹, 笠原 康裕²¹千葉大・院園芸, ²北大・低温科学研

E-mail: amachi@faculty.chiba-u.jp

我々が駿河湾の堆積物より分離した *Pseudomonas* sp. SCT は、ヨウ素酸 (IO₃⁻) を唯一の電子受容体として生育するヨウ素酸呼吸細菌である。SCT 株のペリプラズムにはヨウ素酸存在下で誘導されるヨウ素酸還元酵素 (Idr) が存在する。Idr を Native-PAGE ゲル上で活性染色後、活性バンドを切り出し、これを SDS-PAGE で泳動したところ 3 本のバンドが現れた。これらを LC-MS/MS 解析に供したところ、亜ヒ酸酸化酵素のラージサブユニット (AioA)、スモールサブユニット (AioB)、および 2 種類のシトクロム c ペルオキシダーゼ (CCP) とアノテーションされた合計 4 種類のタンパクが検出された。これらタンパクをコードする遺伝子はゲノム上でオペロン構造を形成し、近傍にはモリブデン補因子の生合成遺伝子が複数存在した。系統解析より、AioA に近縁なタンパクは鉄硫黄モリブデン酵素ファミリー (complex iron-sulfur molybdoenzyme family) の中で新規なクレードを形成することがわかった。このため、これらタンパクを IdrA、IdrB、IdrP1、IdrP2 と名付けた。IdrA にはモリブデン補因子結合サイトと [3Fe-4S] 結合サイトがあり、IdrB には TAT シグナル配列と [2Fe-2S] 結合サイトが存在した。一方、IdrP1 と IdrP2 は既知の CCP とは系統的に異なるタンパクであった。転写解析の結果、*idr* 遺伝子はヨウ素酸呼吸条件下で転写量が顕著に上昇することがわかった。また比較プロテオーム解析の結果、ヨウ素酸呼吸時には Idr タンパクのみならず、過酸化水素スカベンジャー (Ahp, Cat)、過酸化水素誘導性転写因子 OxyR、SOD、酸素高親和性の末端オキシダーゼ (Cyd, Cco) なども発現上昇していた。以上のことから、ヨウ素酸呼吸には新規タンパク Idr が関与すること、またヨウ素酸呼吸に伴って過酸化水素と酸素が発生することが示唆された。Idr はヨウ素酸の還元反応を触媒することで、地球規模でのヨウ素循環に貢献しているかも知れない。

02-07

長時間を要するサンプリングが微生物叢メタトランスクリプトーム解析に与える影響

○元木 香織^{1,2}, 和辻 智郎^{2,3}, 高木 善弘², 徳田 真紀², 笠谷 貴史², 高井 研², 岩崎 渉^{1,4,5}

¹東大・院理, ²JAMSTEC, ³東筑紫短期大学・食物栄養学科, ⁴東大・大気海洋研, ⁵東大・微生物科学イノベーション連携研究機
E-mail: kaori@bs.s.u-tokyo.ac.jp

微生物叢のRNAの網羅的解析であるメタトランスクリプトーム解析は、微生物生態系が持つ活性やその成り立ちなどの全体像を明らかにする上で有効な手法である。ここで、特に微生物のRNAは分解されやすいことから、ある環境下での微生物叢の状態をなるべく正確に反映した解析を行う上では、一般にサンプル回収後迅速に (*in situ*) RNAを安定化することが望ましいと考えられる。しかし、例えば海洋サンプルなど、サンプリングに長時間を要しRNAの安定化処理を *in situ* で行うことが難しい場合には、この条件は必ずしも満たすことができない。

そこで本研究では、長時間を要するサンプリングがメタトランスクリプトーム解析に及ぼす影響を評価した。サンプリングに長時間を要する微生物叢の具体例として、海面下約1000 mに生息する深海無脊椎動物に共生する化学合成細菌叢を対象とした。本微生物叢は、Gammaproteobacteriaに属するMethylococcales、ThiotrichalesおよびEpsilonproteobacteriaに属する *Sulfurovum* の3分類群によって大きく構成される。RNAの安定化処理を *in situ* で(深海で)行った場合と、約3時間かけて船上に揚収した後に行った場合とで、メタトランスクリプトーム解析の結果を比較した。その結果、長時間サンプリング後にRNAの安定化処理を行った場合には、Methylococcalesおよび *Sulfurovum* において遺伝子発現量が全体的に低下した一方で、Thiotrichalesにおいては全体的に増加していることが明らかになった。これは、Thiotrichalesがエネルギー貯蔵の役割をもつ硫黄顆粒の形成とその代謝に関わると見られる遺伝子群を発現していたことから、細胞内の硫黄顆粒によってサンプリングの間にも全体的な代謝活性を保つことができたためであると考えられる。加えて、各分類群内においても、代謝系ごとに発現量の増加・減少の程度にはばらつきが見られた。このばらつきが長時間サンプリングの影響によるものが、あるいは偶然によるものかについても、考察を行なった。サンプリングに長時間を要するメタトランスクリプトーム解析では、*in situ* でRNA安定化を行った場合とサンプリング後に行った場合を比較することで、適切なサンプリング・解析手法を検討することが可能になるだけでなく、サンプリング過程の環境変化を微生物生態系に対する攪乱とみなすことで新たな示唆が得られる可能性もある。

02-08

微生物膜透過性を有するペプチドの探索と評価

○村岡 貴博, 井上 豪, 豊原 大智, モリ テツシ

農工大・院工

E-mail: muraoka@go.tuat.ac.jp

微生物細胞内へ透過する膜透過性物質が注目されている。本研究では、特にペプチドに注目し、その構造と微生物細胞膜透過性の関係性について評価することを目的とした。ペプチドは、有機合成化学の手法により、精密かつ多様な分子合成が可能である。中でも、アミノ酸配列、ペプチド鎖長が微生物膜透過性に与える効果に注目した。両構造パラメーターを系統的に変えたペプチドを網羅的に合成し、大腸菌を用いて透過性について調べた。ペプチドを可視化するために蛍光色素を結合し、微生物細胞内への透過を蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリー測定によって調べた。カチオン性ペプチドとアニオン性ペプチドをの比較した結果、カチオン性ペプチドの方が顕著に高い効率で透過することが示された。過去の研究から、動物細胞の場合でも、一般的にカチオン性ペプチドが高い効率で膜透過することが知られており、それと同様の傾向が示された。続いて、カチオン性アミノ酸と疎水性アミノ酸を混合した両親媒性ペプチドについて評価した。その結果、脂肪族型の疎水性アミノ酸を用いた場合に比べて、芳香族型の疎水性アミノ酸を用いた場合の方が、膜透過効率が高いことが明らかとなった。様々な構造パラメーターが膜透過性に与える効果に関して、詳細に評価した結果を発表する。

02-09

Water-in-oil ドロップレット内での環境微生物の培養と シングルドロップレットアイソレーション技術の開発

○斉藤 加奈子^{1,2}, 大田 悠里^{1,2}, 松倉 智子², 高木 妙子², 森田 雅宗², 常田 聡^{1,2}, 野田 尚宏^{1,2}

¹早大院・先進理工, ²産総研・バイオメディカル

E-mail: kanako2864@akane.waseda.jp

【背景・目的】自然界には約1億種もの微生物が存在しており、それらが持つ機能は食品、医療、環境など様々な分野で利用されている。微生物の機能解明のためには、微生物の単離培養が不可欠だが、既存の培養法の利用だけでは、全体の99%以上の微生物が未だに培養されていない。そのため、未培養微生物を培養するためには全く新しい培養手法が必要である。近年、water-in-oil ドロップレットを利用した微生物培養法が注目されている。マイクロ流路を使用すると数十万単位のドロップレットを容易に作製でき、ドロップレット内で微生物を培養することで、ハイスループットな完全液相培養が可能となる。また最近、我々は、微生物が持つRNase活性を指標に微生物が増殖したドロップレット集団のみを選択的に分取する方法を開発した(Ota et al., PLOS One, 2019)。しかし、新規微生物の単離株獲得のためには、ドロップレット集団からドロップレットを1つずつ分離し、個々のドロップレットに対して菌種同定と再培養を行う必要がある。そこで本研究では、新規微生物の単離培養を目指して、環境微生物のドロップレット培養、RNase活性に基づいたドロップレット集団の選択的分取、1ドロップレットへの分離からなる一連の技術を開発した。【方法・結果】まず、蛍光RNAプローブのドロップレット内での安定性を評価した。蛍光RNAプローブを含むドロップレットを37℃でインキュベーションすると、40日経過後もドロップレットの崩壊が生じず、蛍光基質の漏出もなかった。次に、モデル環境微生物として池由来の複合微生物試料を使用し、蛍光RNAプローブとともに、1 nLのドロップレットへ封入した。ドロップレット培養後に顕微鏡で観察すると、池由来の微生物は高密度に増殖した。フローサイトメトリーによってドロップレットの蛍光強度を測定すると、培養の前後で蛍光強度に違いが生じたため、セルソーターによって蛍光強度の大きいドロップレット集団を分取した。先端が極細のピペットチップを使用してドロップレットの分離を試みたところ、顕微鏡観察にて1ドロップレットずつに分離された様子が確認された。本研究より、1ドロップレットへの分離を含むwater-in-oilドロップレット培養技術は、様々な微生物の培養や分離に応用できる可能性が示唆された。

02-10

リポソームを用いたシングルセルレベル培養技術の構築

○森田 雅宗, 加藤 薫, 野田 尚宏

産総研・バイオメディカル

E-mail: morita.m9@aist.go.jp

微生物の物理的特徴や生理学的機能の理解、また、微生物による物質生産や代謝産物の取得において、微生物の分離・培養は非常に重要である。近年、マイクロ流体デバイスを用いてチップ内でマイクロスケールのウェル・ゲル・油中水滴を大量に作製する技術が進展し、一つの区画にシングルセルレベルで微生物を分離、培養し、解析することが可能となり注目されている。しかし、ゲルや油中水滴等の材料は以前から使用されているもので、多種多様な微生物の獲得に、材料そのもののさらなる技術的発展は必要である。細胞膜と同様の構造をした脂質二重膜で形成されるカプセル状構造のリポソームは、内部への物質封入が可能である。中でも、マイクロスケールのリポソームは生体分子に限らず、粒子や細胞など多岐にわたる材料を封入することが可能であり、また、リポソームはその内側と外側が水溶液で満たされるので、膜を介した分子(栄養)の流入出も可能となり、微生物の培養リアクタとしての可能性を十分秘めている。これまでマイクロスケールのリポソーム内部へ微生物を封入する報告例はあるが、リポソーム内部での微生物の成長・増殖についての報告はない。本発表では、マイクロスケールのリポソーム内部で長時間・安定的に微生物がシングルセルレベルから成長・増殖する技術について報告する。モデル微生物として用いた大腸菌を1-2細胞レベルで封入した直径10-30 μ m程度のリポソームを遠心型マイクロ流体デバイスを用いて作製した。得られた微生物封入リポソームを、37℃の培養条件下で長時間・物理的に安定な状態で観察するために、脂質膜でコートしたガラス基板上に固定化する手法を考案した。通常のガラス基板上に固定化したリポソームは観察開始後24時間で20%程度しか残存しないのに対し、脂質膜でコートしたガラス基板上に固定化したリポソームは70%程度残存することが明らかになり本手法の優位性を明らかにした。また本手法で、大腸菌の培養を行ったところ、48時間程度の連続観察に成功し、リポソーム内で菌体密度の高い状態にまで培養することに成功した。以上のことから、リポソームは微生物培養器として今後の研究展開に応用できる可能性を示した。

02-11

自家蛍光シグネチャーを用いた微生物の生死評価

○下段 千尋¹, 高部 響介², 野村 暢彦², 八幡 穰²

¹筑波大・生命環境学群, ²筑波大・生命環境

微生物の生死の判定においては、サンプルを希釈してプレートに撒き、培養してコロニー形成の有無を見る方法が主に用いられている。しかし、この方法では、判定までに1日あるいは数日という長い時間を要する上に、生菌の生育に適した条件を用意しなければコロニーとして検出されず、使用できる対象が限られている。そこで本研究では、培養を介することなく微生物の生死を迅速に判定できる技術を開発することを目的とした。細胞の状態を一細胞レベルの解像度かつ無処理、非染色で判定するために、我々は一細胞の“自家蛍光シグネチャー”に注目した。自家蛍光シグネチャーとは、細胞内の酵素や脂質など生体分子に由来する微弱な蛍光の集合体であり、様々な生理状態を反映することがこれまでの研究から分かっている。我々の研究グループでは、一細胞の自家蛍光シグネチャーを網羅的に解析する手法として、共焦点レーザー顕微鏡による自家蛍光取得と、画像解析、機械学習による分類を組み合わせたConfocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis : CRIF、特許第6422616号)をこれまでに開発している。これまでに、この手法を用いて生物種や細胞の増殖段階などの違いが判別できることが分かっている。本研究では、このCRIFを用いて微生物の生細胞と死細胞の、自家蛍光シグネチャーの違いを詳細に比較した。モデル生物として*Escherichia coli* K12株を用い、この株を対数増殖期まで培養し、自家蛍光を取得した。同培養液の菌に対してプレート培養とLive/Dead染色を行った。培養後エタノールにより殺菌処理をしたものに対しても同様の操作を行い、得られたそれぞれの自家蛍光シグネチャーの違いを評価した。上記により、従来の手法で「生菌」「死菌」と判定された集団どうしでの、自家蛍光シグネチャーを比較した結果を報告する。CRIFで生細胞と死細胞を比較することで、この手法が迅速かつ簡便な微生物の生死判定技術となる可能性を検証できる。

02-12

陸域深部地下珪藻質泥岩層から単離した鉄還元能を有する新規*Bacteroidetes* 門発酵性細菌の機能解析

○玉澤 聡¹, 上野 晃生¹, 玉木 秀幸², 玉村 修司¹, 村上 拓馬¹, 木山 保¹, 猪股 英紀¹, 宮川 和也³, 長沼 毅⁴, 金子 勝比古¹

¹幌延ライズ, ²産業技術総合研究所, ³日本原子力研究開発機構, ⁴広島大院・統合生命科学

E-mail: satoshi.tamazawa@h-rise.jp

北海道北部地域に広がる天塩平野の地下には、新生代新第三紀中新世から鮮新世に掛けて海成堆積物により形成された珪藻質泥岩層が分布している。還元的な同層の地層水からは微生物起源のメタンが検出されていることから、微生物による堆積有機物の発酵分解とメタン生成反応の進行が推測され、その中でも発酵性細菌は嫌気的な有機物分解過程において重要な役割を担っているものと考えられた。これまで珪藻質泥岩層試料の分子生態学的解析によって、発酵性細菌と推定される微生物群は多数検出されていたが、分離培養されておらずその機能の大半は不明であった。そこで本研究では、陸域深部地下珪藻質泥岩層に生息する発酵性細菌の分離培養化と機能解析を目的とした。

JAEA 幌延深地層研究センターの地下250 m地点から採水した珪藻質泥岩層の地層水を微生物接種源として用い、地層水のイオン組成を模擬した無機塩培地をベースに、基質としてトリメチルアミン及び酢酸を添加し、気相N₂/CO₂ (4:1, v/v)の嫌気的環境下、25℃で集積培養を実施した。4回以上の継代培養の後、酵母エキスを単独基質とした限界希釈培養とアガーシェイク法により、新規発酵性細菌HJ250株の単離に成功した。16S rRNA 遺伝子の分子系統学的解析の結果、HJ250株は*Bacteroidetes* 門の*Marinilabiliales*目に属するものの、最近縁種の*Draconibacterium orientale* FH5株とは88.6%の相同性しか示さず、少なくとも科レベルで新規な系統群に分類されることがわかった。生理性状解析の結果、HJ250株は15-37℃、pH 6.0-9.0、NaCl 0-80 g/Lで生育可能な糖資化性の絶対嫌気性発酵性細菌であり、原位置地下環境(20℃, pH 7, NaCl 4.0 g/L程度)に適応した生理学的特徴を有していた。加えて興味深いことに、*Bacteroidetes*門細菌としては報告例の極めて少ない、鉄還元能を有することが明らかとなった。続いて、分離源として用いた地下250 mの地層水から抽出したDNA及びRNA (cDNA)の微生物群集構造解析の結果、HJ250株と100%の相同性(251/251 bp)を示す配列がDNAだけでなくcDNAからも検出された。さらに、地下140 mと350 m地層水由来のDNA及びcDNAからも検出され、中でも地下140 mのcDNAにおいては全322 OTUsの中で第三番目の相対存在量を示した。以上の結果から、HJ250株は原位置に確かに生息しており、珪藻質泥岩層の特に比較的浅部域における炭素及び鉄循環に大きく寄与している可能性が示唆された。

02-13

シュードフルクトフィリック乳酸菌 *Leuconostoc citreum* F192-5 株の
菌株特異的な環境適応○遠藤 明仁¹, 前野 慎太郎², 谷澤 靖洋³, 梶川 揚申⁴, 兼崎 友⁵, 久保田 恵理^{2,6}, 有田 正規⁷, Leon Dicks⁸¹農大・食香粧化学科, ²農大院・生物産業学, ³遺伝研・DDBJ 研究センター, ⁴農大・農芸化学,⁵静大・グリーン科学技術研究所, ⁶農大・ゲノムセンター, ⁷理研・環境資源科学研究センター,⁸ステレンボッシュ大・微生物学

E-mail: a3endou@nodai.ac.jp

【背景】

Leuconostoc citreum は植物質環境に生息する一般的な乳酸菌であり、グルコースを糖源として最も好む。しかし、我々が南アフリカの温州ミカンより分離した *L. citreum* F192-5 株はグルコースを糖源とした培養ではほとんど生育せず、フルクトースを糖源とするか、グルコースが糖源の場合はピルビン酸や酸素といった電子受容体存在下でのみ良好な生育を見せるというフルクトフィリック様な特徴を有している。本研究では F192-5 株を用いて、これまでに見出されてこなかった乳酸菌の菌株特異的な環境適応に迫った。

【結果及び考察】

まず、F192-5 株と 9 菌株の *L. citreum* のゲノムデータを比較したところ、F192-5 株と他の *L. citreum* 菌株ではゲノムサイズ、遺伝子数に大きな差はなかった。一方で典型的な FLAB と比較すると、F192-5 株はゲノムサイズが大きく、他の FLAB に見られる糖代謝関連遺伝子の特異的な欠落が全く見られなかった。次に、F192-5 株の菌株特異的遺伝子を抽出したところ、68 個の遺伝子が見出され、そのうち 8 個が FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属細菌と共有していた。*Fructobacillus* 属は *adhE* を欠損し、フルクトフィリックな特徴を有していたが、F192-5 株は *adhE* を有しているものの、*adhE* を発現していないことが分かった。これは F192-5 株の *adhE* 上流にはプロモーター領域が予測されなかったことから、*adhE* が不活性化しているためであると考えられた。そこで、外来性の *adhE* を導入したところ、グルコースを糖源として良好な生育を見せたことから、F192-5 株は *adhE* の不活性化によりフルクトフィリックな特徴を獲得したことが明らかとなった。我々はこれらの結果から、フルクトフィリック様な特徴を有する F192-5 株をシュードフルクトフィリック乳酸菌と分類した。

本研究から、自然界には菌株レベルでフルクトフィリック様な特徴を有する乳酸菌が存在している可能性が示唆された。これは菌種内で多様性をもつという乳酸菌の生残戦略の一つによるものであると考えられる。

02-14

フルクトフィリック乳酸菌の環境適応と進化

○前野 慎太郎¹, 谷澤 靖洋², 梶川 揚申³, 志波 優⁴, 兼崎 友⁵, 久保田 恵理⁶, 有田 正規^{2,7}, 遠藤 明仁⁸¹農大院・生物産業, ²遺伝研・DDBJ 研究センター, ³農大・農芸化学, ⁴農大・分子微生物, ⁵静大・グリーン科学技術研究所,⁶農大・ゲノムセンター, ⁷理研・環境資源科学研究センター, ⁸農大・食香粧化学

E-mail: 47617002@nodai.ac.jp

【研究背景】

フルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) は花やミツバチの消化管などフルクトース豊富な環境に生息する乳酸菌群であり、FLAB としてこれまでに *Fructobacillus* 属 5 菌種と 2 種の *Lactobacillus* 属細菌が報告されている。一般的な乳酸菌はグルコースを糖源として最も好むが、FLAB はグルコースを糖源とした培地においてほとんど生育しない。一方で、フルクトースを糖源として培養をするか、グルコースを糖源としても、酸素やピルビン酸といった電子受容体存在下でのみ良好な生育を示すという稀有な特徴を有する。本研究では、FLAB がフルクトース豊富な環境下で行ってきた進化にゲノムレベルで迫る。

【結果及び考察】

まず FLAB とその近縁菌群のゲノムを比較解析したところ、FLAB はゲノムサイズを有意に小さくし、糖代謝関連遺伝子をはじめとする多くの遺伝子を欠落させていた。一般的に乳酸菌は糖を細胞内へ取り込む際に Phosphotransferase system (PTS) を用いることが多いが、FLAB は PTS を完全に欠損していた。これらのゲノムの特徴は FLAB が代謝可能な糖の種類が非常に少ないという生化学的特徴と合致している。また、FLAB は酸素によって生育促進されるが、一般的な乳酸菌と同様に呼吸鎖を有しておらず、FLAB は酸素を電子受容体として用いていることが強く示唆された。さらに、FLAB はグルコース代謝からのエタノール生産に密接に関わるタンパク質 *AdhE* をコードする遺伝子 *adhE* を特異的に欠損していることが明らかとなった。この欠損により FLAB はフルクトフィリックな特徴を有していると考えられたため、FLAB の代表菌種 *Fructobacillus fructosus* に、近縁種由来の *adhE* を導入した。その結果、形質転換株は一般的な乳酸菌と同様にグルコースを糖源とする培地で良好な生育を示した。この結果から、FLAB のフルクトフィリックな特徴は *adhE* の欠損によるものであることが明らかとなった。本研究より、FLAB はフルクトース豊富な環境に誘導されゲノムサイズを小さくし、代謝系をシンプルにするという退行的進化を行ってきたことが示された。

02-15

深海底熱水活動域で発生する電流が現場に優占する化学合成微生物に及ぼす影響

○武藤 久¹, 岡本 章玄², 丸山 奈津², 澤山 茂樹³, 中川 聡^{1,3}

¹京大・院農, ²物質材料研究機構, ³海洋研究開発機構

E-mail: mutou.hisashi.78w@st.kyoto-u.ac.jp

暗黒の深海底熱水活動域では、海底から噴出する熱水に含まれる還元的無機化合物が、現場に見られる生態系にとってほぼ唯一のエネルギー源であると考えられてきた。だが近年、深海底熱水活動域では、還元的な熱水と酸化的な海水が導電性の硫化鉱物を介して接することで電流が生成していることが明らかとなった。既知の鉄酸化細菌のなかには、このような電気エネルギーを利用し、二酸化炭素から有機物を合成する能力を持つものが知られている。これらのことから、深海底熱水活動域において、電気をエネルギー源とする（微）生物活動（特に一次生産）の可能性が指摘・検証されるようになってきた。例えば、深海底熱水活動域に由来するチムニーサンプルを電気培養し、*Shewanella*属細菌や、*Thermococcales*目および*Archaeoglobales*目アーキアのような従属栄養微生物が集積培養されるなど、熱水活動域に見られる微生物群集の電流に対する反応が報告されている。しかしながらこれまでの研究において、世界各地の深海底熱水活動域に優占して検出される絶対化学合成微生物＝イブシロンプロテオバクテリアに及ぼす電流の影響を解析した例はなかった。そこで本研究では、過去の研究において深海底熱水活動域から得たイブシロンプロテオバクテリア分離株の電気化学的特性、特に電気エネルギーがその増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

深海底熱水活動域に優占するイブシロンプロテオバクテリアの代表的な分離株について、diaminobenzadine (DAB) 染色に供し超薄切片を作成したところ、いずれも細胞外膜が強く染色され、電気エネルギーの利用に必要な膜表面電子伝達酵素の存在が示唆された。現在当該分離株の電気エネルギー利用能を、熱水活動域を模した様々な条件下で検証しており、本発表ではそれらの結果を含めて議論したい。

02-16

鉄および硫黄を還元する好熱性タウムアーキア

○加藤 真悟^{1,2}, 伊藤 隆¹, 雪 真弘¹, 大西 真史^{1,4}, 長森 麻衣^{1,4}, 植松 勝之³, 鈴木 勝彦², 高品 知典⁴, 大熊 盛也¹

¹理研・BRC, ²海洋研究開発機構海底資源センター, ³マリンワークジャパン, ⁴東洋大・院生命科学

E-mail: skato@riken.jp

これまでに培養されている Thaumarchaeota 門に属するアーキア（古細菌）は、*Nitrosopumilus maritimus* や *Nitrososphaera viennensis*, *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* 等、すべてアンモニア酸化アーキアである。一方で、培養に依存しないメタゲノム解析によって、Thaumarchaeota 門の根元に位置するアーキアは、非アンモニア酸化アーキアであることが示唆されてきた。それらのアーキア群には、陸上温泉からしばしば検出される Terrestrial Hot Spring Creanarchaeotic Group (THSCG) と呼ばれる未培養系統群が含まれる。本研究では、栃木県奥塩原で採取した温泉水（57℃, pH2.2）から、THSCG に属するアーキア NAS-02 株の分離培養に成功した。NAS-02 株は、温度幅 60-70℃、pH 幅 4.5-5.5 の範囲で増殖する嫌気性のアーキアであり、酵母エキスを電子供与体および炭素源として用い、電子受容体として三価鉄および硫黄化合物（チオ硫酸、元素硫黄）を還元して生育することがわかった。NAS-02 株の全ゲノム配列（約 1.6 Mbp）を決定したところ、NAD(P)H:sulfur oxidoreductase (Nsr) や thiosulfate reductase / polysulfide reductase (Phs/Psr), sulfur reductase (Sre) といった硫黄還元に関わる遺伝子のホモログがいくつか見つかった。系統解析の結果、これらの遺伝子は、クレンアーキオータ門に属するアーキアからの水平伝播によって獲得されたものであると示唆された。公開データベースに登録されている THSCG の 16S rRNA 遺伝子配列を探索したところ、世界各地の高温酸性の陸上温泉や海底熱水地帯から検出されていることがわかった。以上の生理性状および地理分布の結果から、THSCG は高温環境において、他の生物の死骸に由来するタンパク質や脂質を分解する「スカベンジャー」として、生態系の炭素・鉄・硫黄の循環において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

02-17

水素生成一酸化炭素酸化細菌 *Parageobacillus* sp. G301 株の生理性状およびゲノム解析

○日野 太貴, 井上 真男, 谷村 あゆみ, 岡元 俊輔, 吉田 天士, 左子 芳彦

Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.

E-mail: hino.taiki.46a@st.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】水素 (H₂) 生成一酸化炭素 (CO) 酸化細菌は、CO をエネルギー源として増殖する。本菌における CO 酸化は嫌気型 CO デヒドロゲナーゼ (CODH) により触媒され、ゲノム上で CODH に隣接する膜結合型ヒドロゲナーゼ (ECH) と複合体を形成することで CO 酸化と共役した H₂ 生成とエネルギー保存を行う。H₂ 生成 CO 酸化細菌の分離株は、これまで Firmicutes 門 Clostridium 綱の偏性嫌気性好熱菌に偏在してきた。ごく最近、通性嫌気性の Bacillus 綱 *Parageobacillus thermoglucosidasius* が高濃度 CO 存在下で CO 依存的な H₂ 生成を行い増殖することが報告された。こうした背景のなか、鹿児島県鰻池の湖底堆積物より H₂ 生成 CO 酸化能を有する *Parageobacillus* 属細菌 G301 株の分離に成功した。そこで本研究では、本分離株のゲノム性状および生理性状を明らかにすることを目的とした。

【方法】本菌のゲノム DNA を抽出し、MiSeq (Illumina) を用いたメイトペアシーケンスを行い、SPAdes を用いてドラフトゲノムを構築した。DFAST を用いて ORF 予測およびアノテーションを行い、近縁株とのゲノム比較解析を行った。気相 100% CO あるいは N₂ 雰囲気下および大気条件下において 65 °C で合成培地を用いて本菌を培養し、直接計数およびガスクロマトグラフィーによって菌数と気相の変化を測定した。また、API 50CH (BIOMERIEUX) を用いて糖発酵能を判定した。

【結果・考察】ゲノム解析の結果、G301 株は *Parageobacillus toebii* に最も近縁であり、Average Nucleotide Identity (ANI) が 97.3% を示すことから *P. toebii* と同種と判断した。G301 株は *P. toebii* NBRC 107807^T 株と同様に大気条件下で好気呼吸、100% N₂ 雰囲気下では発酵を行って増殖したが、発酵において利用可能な糖源は異なっていた。一方、既報の本種 9 株の内、G301 株のみが CODH/ECH を有した。さらに、本株のみが CO 依存的な H₂ 生成能を示した。Bacillus 綱細菌において G301 株は、2 例目の H₂ 生成 CO 酸化細菌の報告事例であり、本代謝の系統的分布の広がりか推察された。また、G301 株ゲノムには既報の *P. toebii* と同様に *P. thermoglucosidasius* には見られない好気型 CODH の遺伝子群がコードされており、嫌気型および好気型 CODH の両方を有する初めての H₂ 生成 CO 酸化細菌であることが明らかになった。このことは G301 株が生育環境に応じて両酵素を使い分ける可能性を示唆するものである。

02-18

養殖場由来多剤耐性伝達性プラスミドのトランスポゾンを経る染色体への組込み

○野中 里佐¹, 丸山 史人², 杉本 侑大³, 鈴木 聡³, 増田 道明¹, 矢野 大和⁴

¹獨協医大・医, ²広島大・学術院, ³愛媛大・CMES, ⁴東北大・院生命科学

E-mail: nonaka@dokkyomed.ac.jp

細菌間の遺伝子伝達は耐性薬剤菌の出現や拡散の原因として極めて重要である。本研究では、養殖場から分離された多剤耐性菌が保有するプラスミドが大腸菌に伝達されて染色体に組み込まれる現象の背景にある分子機構を明らかにすることを目的とした。養殖場底泥から分離した *Vibrio alfacensis* 04Ya249 株および同株との接合で得られた薬剤耐性大腸菌株の全塩基配列を PacBio RSII により決定し、04Ya249 株から大腸菌に伝達された全遺伝情報を明らかにした。その結果、04Ya249 株が保有していたプラスミド pSEA2 の大腸菌への伝達と染色体への部位特異的な組込みが明らかになった。pSEA2 は我々が以前報告したプラスミド pSEA1 (Nonaka *et al.*, PLOS ONE, 2018) と骨格構造を共有しており、IV 型分泌系関連遺伝子や 7 つの薬剤耐性遺伝子を保持していたが、pSEA1 の染色体への組込みに関わるトランスポゾン Tn6283 は保持していなかった。接合体染色体に組込まれた pSEA2 の両端には β ラクターマーゼ遺伝子 (*bla*) を含む 7.5 kb の領域がそれぞれ存在していた。この領域は、Tn6283 と同様、2 つのチロシンリコンビナーゼをコードし、pSEA2 とは独立に環状化して染色体外にも存在することから、インテグレート型エレメントタイプの新規トランスポゾン (TnX) と考えられた。TnX をあらかじめ染色体上に持つ大腸菌を受容菌とした場合、染色体への pSEA2 の組込み頻度は 10 倍高くなった。また、*recA* 欠損大腸菌を受容菌とした場合、TnX の染色体への組込みは検出されたが、pSEA2 全長の組込みは見られなかった。これらの結果は、接合の際にまず TnX が染色体に組み込まれ、この TnX と染色体外の pSEA2 上の TnX との間での RecA 依存的相同組換えによって pSEA2 全長が染色体に組み込まれることを示唆している。なお、複数の接合体大腸菌株を解析した結果、染色体上の TnX は最大 3 コピーまで検出され、TnX のコピー数が多い接合体ほど β ラクタム系抗菌薬の最小発育阻止濃度が高かった。以上の結果は、プラスミドとトランスポゾンの相互作用を介した遺伝子伝達が、受容菌の多剤耐性化とともに、その高度耐性化にも関与することを示唆する。

02-19

***Bifidobacterium adolescentis* のヒト腸内環境適応因子の探索**○藤原 慎¹, 田村 明¹, 馬場 星吾², 川畑 球一³¹(株)明治・乳酸菌研, ²(株)明治フードマテリア, ³甲南女子大・医療栄養

【目的】

Bifidobacterium 属細菌は乳児から成人の主要な腸内細菌である。*B. bifidum*、*B. breve* や *B. longum subsp. longum* ではヒト腸管適応に関する研究が数多くあるのに対し、ヒト腸内細菌優勢種の一つである *B. adolescentis* についての知見は限られている。そこで本研究では、分離源の異なる *B. adolescentis* (ヒト糞便、ヒト母乳と(ウシ)ルーメン)間でのゲノム比較を行い、ヒト糞便に特徴的な機能遺伝子を解析した。

【方法】

Genbank より、ヒト糞便由来株として *B. adolescentis* ATCC15703、LMG10733 と LMG18897、ヒト母乳由来株として 22L、ルーメン由来株として DSM20087 と LMG11579 の完全長あるいはドラフトゲノムを取得した。これらのゲノムを DFAST よりアノテーションした。OrthoFinder を用いてオルソログ遺伝子を決定した後、分離源特異的遺伝子の注釈付けを行った。

【結果と考察】

ヒト糞便、ヒト母乳とルーメン由来のパングゲノムとして、それぞれ 2041 個、1796 個と 1709 個の遺伝子を決定した。これらのパングゲノムにおいて、分離源パングゲノム毎の特異的遺伝子はそれぞれ 367 個、179 個と 149 個であった。これらの特異的遺伝子において、COG 機能分類されたものはそれぞれ 121 個、58 個と 80 個であった。COG 機能分類において、多くの遺伝子が割り当てられたカテゴリーは、ヒト糞便では K(Transcription : 16.5%) や G(Carbohydrate transport and metabolism : 14.0%)、ヒト母乳では G(29.3%) そしてルーメンでは E(Amino acid transport and metabolism : 27.5%) であった。G カテゴリー分類された遺伝子において、ヒト糞便では加水分解関連遺伝子が、ヒト母乳では輸送体関連遺伝子がそれぞれ多かった。以上の結果より、*B. adolescentis* は糖の加水分解関連遺伝子を多くコードすることでヒト腸内環境に適応している可能性が考えられた。

02-20

古細菌から細菌に水平伝播した鉄ヒドロゲナーゼの進化○渡邊 友浩¹, Tristan Wagner¹, Gangfeng Huang¹, Joerg Kahnt¹, 安宅 憲一², Ulrich Ermler³, 嶋 盛吾¹¹マックスプランク研・陸生微生物, ²ベルリン自由大, ³マックスプランク研・生物物理

E-mail: watanabe1986@gmail.com

ゲノムデータは遺伝子資源の宝庫であり、未知遺伝子の機能解析はポスト環境ゲノム時代におけるフロンティアの 1 つである。相同性に基づき機能が記載されている遺伝子であっても、その真の機能を明らかにするためには、多面的な研究が必要な場合がある。本研究では、公共データベースの解析を出発点として、遺伝子水平伝播を介して酵素が新たな基質との反応性を獲得したことを見出した。好熱性硫黄還元菌 *Desulfurobacterium* 属のゲノムには、鉄ヒドロゲナーゼのパラログ (以下、HmdII) と、鉄ヒドロゲナーゼの補欠分子族 (以下、FeGP コファクター) の生合成遺伝子に類似する配列が存在する。しかし、鉄ヒドロゲナーゼはメタン菌以外の生物からは見つかっておらず、その基質である C₁ キャリアー、テトラヒドロメタノプテリン (H₄MPT) は *Desulfurobacterium* 属を含むほとんどの細菌では合成されない。このため、細菌における HmdII および FeGP コファクター生合成遺伝子の存在意義は不明であった。我々は、*Desulfurobacterium* 属細菌のプロテオームからこれらの遺伝子産物を検出するとともに、本細菌がメタン菌に匹敵する量の FeGP コファクターを生産していることを確認した。FeGP コファクターと細菌 HmdII から合成したホロ酵素は、H₄MPT 誘導体を用いた水素化反応を触媒したが、細菌の C₁ キャリアー、テトラヒドロ葉酸 (H₄F) の誘導体も同反応に利用した。メタン菌の HmdII は H₄MPT 誘導体のみを反応基質としたことから、H₄F 誘導体の水素化反応は細菌 HmdII に固有の特性であるといえる。HmdII の活性は鉄ヒドロゲナーゼの約 10000 分の 1 であり、水素ガスに対する親和性は約 10 分の 1 であった。この様に本酵素は水素ガスと反応するが、異化代謝系酵素であるとは考え難く、水素センサーとして機能するものと考察している。進化系統樹解析の結果、本酵素がメタン菌において発生した後に遺伝子の水平伝播を介して細菌に取り込まれたことが分かった。細菌 HmdII は細菌細胞環境に適応するために H₄F 誘導体との反応性を獲得したと考えられ、その基質結合部位が H₄F 誘導体と結合するために絶妙に調整されていることが X 線結晶構造から示された。

02-21

捕食性バクテリア *Candidatus Uab amorphum* と近縁株 3 株のゲノム比較

○白鳥 峻志¹, 鈴木 重勝², 柿澤 侑花子³, 浜崎 大雅³, 矢吹 彬憲¹, 石田 健一郎⁴

¹海洋研究開発機構, ²国立環境研究所, ³筑波大・院・生命環境, ⁴筑波大・生命環境系

E-mail: tshiratori@jamstec.go.jp

Candidatus Uab amorphum は 2015 年に西太平洋熱帯域の表層海水から分離された Planctomycetes に近縁なグラム陰性細菌である。これまでの研究から、本生物は直径約 5 μ m の大型で柔軟な細胞、発達した繊維状構造をもち、他のバクテリアや小型の真核生物を包み込んで捕食することが明らかとなっている。Ca. *Uab amorphum* は真核生物のファゴサイトーシスに似た捕食を行う初めての原核生物であり、進化的な重要性だけでなく、捕食者としての生態的な役割についても興味深い。我々は 2017 年に西太平洋熱帯域で採集したホヤ、巻貝の殻、表層海水から、Ca. *Uab amorphum* に近縁な 3 培養株を確立することに成功した (SRT713 株、SRT719 株、SRT722 株)。これらの培養株はいずれも Ca. *Uab amorphum* と同様に、直径約 5 μ m の大型で柔軟な細胞をもち、他の微生物を包み込んで捕食の様子が観察された。16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析では、これらの培養株は Ca. *Uab amorphum* と単系統群を形成し、Ca. *Uab amorphum* との配列の相同性はそれぞれ 82.8%、91.5%、96.5% だった。本研究では Ca. *Uab amorphum* に近縁な新規培養株 3 株について、MinION 及び Illumina HiSeq によって全ゲノム配列を決定し、Ca. *Uab amorphum* との比較を行った。ゲノムサイズは Ca. *Uab amorphum* が約 9.6 Mbp であるのに対し、SRT713 株が約 9.0 Mbp、SRT719 株が約 7.0 Mbp、SRT722 株が約 11.4 Mbp であった。いずれの培養株も Ca. *Uab amorphum* と同様に、シグナル伝達に関わる遺伝子が近縁種に比べて多いことや、プリン、ピリミジンの新規生合成能を欠くことが明らかとなった。また、多くのアミノ酸の生合成能も欠いていたが、合成可能なアミノ酸の種類は株ごとに差異が見られた。発表では Ca. *Uab amorphum* 及びその近縁株に見られる真核生物的な特徴に関わる遺伝子についても議論したい。

02-22

根粒菌の窒素固定遺伝子を含むゲノム欠失と土壤環境適応

○嵐田 遥, 大竹 遥, 菅原 雅之, 三井 久幸, 南澤 究

東北大院・生命

E-mail: harashida@ige.tohoku.ac.jp

根粒菌は共生窒素固定能の獲得・欠失を繰り返し、土壤生活と共生生活に適応することが示唆されているが、その実験的証明はない。*Bradyrhizobium* 属根粒菌ゲノム (9-10 Mb) 上には、共生窒素固定遺伝子群が密集する外来性の共生アイランド (670-1000 Mb) が存在するが、その構造は近縁菌株間でも異なる。*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 株と *Rj2* 宿主ダイズ間で特異的に起こるエフェクター誘導性免疫 (*Rj2* 共生不和合性) を回避し、根粒形成した USDA122 変異株ゲノムを解析したところ、同種・同方向の挿入配列 (Insertion sequence: IS) 間で起こる相同組換えにより、*Rj2* 共生不和合性に関与する三型分泌系タンパク質をコードする *rhc*、エフェクタータンパク質をコードする *nopP*、および窒素固定に関与する *nif* 遺伝子群を欠失していた。欠失株生成過程として、(i) 根圏における植物との相互作用と、(ii) 確率的な IS 介在型欠失生成の可能性が考えられた。また、根粒形成 *nod* 遺伝子は変化せず *nif* 遺伝子が欠失すると、宿主を騙す (cheating) 根粒菌となるが、IS 介在型欠失で生成される *nif* 欠損根粒菌の生態的意義は不明である。本研究目的は、(i) 自由生活条件下での確率的な欠失株生成の有無と (ii) *nif* 欠損株の生態的意義を解明することである。本研究では、USDA122 に対してネガティブ選択マーカー *sacB* を共生アイランドの *rhc* 遺伝子群の遺伝子間領域に挿入した変異株 (122S1) を作製し、スクロース含有寒天培地を用いて自由生活条件下における確率的な IS 介在型欠失の検出を試みた。122S1 を 5 日間液体培養後、スクロース含有培地上に生育したスクロース耐性株を 32 株選抜した。これらゲノムの MiSeq ショートリードを取得し、参照ゲノム配列に対するマッピング解析を行ったところ、32 株中 22 株で *sacB* と共に *nif*, *rhc* 遺伝子群が同種・同方向の IS を介して欠失していた。したがって、自由生活下で根粒菌の共生窒素固定能欠落が確率的に起こることが示唆された。自由生活下での IS 介在型欠失によるゲノム縮小は、根粒菌ゲノムの複製効率を上昇させ得る。また、IS 介在型 *nif* 欠損株は野生株に比べ、微好気条件下でのニトロゲナーゼ転写発現コストの軽減等も予測された。そこで、野生株と IS 介在型 *nif* 欠損株の、土壤環境を模した多様な自由生活条件下での増殖速度を比較し、IS 介在型欠失が複製効率・増殖速度を上昇させるか検討を行った。その結果について議論したい。

02-23

排水中の細菌が微細藻類の増殖に及ぼす影響

○遠山 忠¹, 田中 靖浩¹, 森川 正章², 森 一博¹

¹山梨大・総研部, ²北大院・環境

E-mail: ttohyama@yamanashi.ac.jp

【目的】微細藻類は、バイオディーゼルなどの燃料や有益な生理学的効果を有する高付加価値物質などを生産する有望なバイオマス資源の一つである。経済的かつ持続可能に微細藻類バイオマスを生産することを目指し、下水や排水を利用して微細藻類を培養する試みが注目されている。一方、海洋や湖沼などの自然環境中では、微細藻類は共存する細菌群の影響を受けながら生育している。そのような環境中では、ある特定の細菌群が微細藻類の増殖を促進していることを示す証拠が多く報告されている。これらの細菌群は、microalgae growth-promoting bacteria (MGPB) と称されている。しかしながら、排水中の MGPB の生態や特徴、その増殖促進効果などの詳細はほとんど分かっていない。本研究では、排水中の細菌群が3種類の微細藻類 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*) の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。【方法および結果】今回我々は、3種類の排水処理施設から採取した排水をオートクレーブにて滅菌処理したものと、オートクレーブ処理せずに生菌を残したものとに分け、合計6種類の排水を用いて3種類の微細藻類を培養した。その培養実験を通じて、排水中の細菌群が微細藻類の増殖を有意に促進することが観察され、その細菌群による微細藻類増殖促進は3種類の排水および3種類の微細藻類に共通していた。すなわち、この結果から、排水中にはMGPBが広く存在していることが示唆された。排水を用いた培養中に微細藻類と共生する細菌を80株以上分離して系統解析したところ、その分離株のほとんどが *Alphaproteobacteria* 綱に属する細菌であった。さらに、個々の分離株をそれぞれの宿主藻類と共培養した結果、分離株の7割以上が宿主微細藻類の増殖を促進したものの、1割程度の分離菌株は宿主微細藻類の増殖を阻害した。この結果から、排水中において微細藻類はMGPBと共存しているものの、増殖阻害細菌とも共存していることが示唆された。今後、優秀なMGPBを特定することができれば、微細藻類培養のプロバイオティクス材料として応用し、微細藻類バイオマスの増産が期待できる。

02-24

オキナワモズク共存細菌群の網羅的解析法の構築

○宇江城 蘭¹, 田中 厚子², 新里 尚也³, 伊藤 通浩³

¹琉球大・院理工, ²琉球大・理, ³琉球大・熱生研

【目的】大型藻類の生育には共存する細菌が重要である。褐藻および緑藻では形態形成に、紅藻では遊走子着底に細菌が関与する例が報告されている。重要水産資源である褐藻オキナワモズク (以下モズク) でも、共存細菌が藻体の生育に関与すると想定されるが、モズク共存細菌群に関する知見は殆ど無く、その機能は不明である。モズク共存細菌群の生態と機能を解明し、モズクの生長に関与する細菌群を発見することは、共存細菌を利活用する新規養殖技術の開発の端緒となると考えられる。本研究では、モズク共存細菌群の生態と機能の解明に向け、1) モズクのメタゲノムおよびメタ 16S 解析法の構築、2) メタゲノムおよびメタ 16S データに基づくモズク共存細菌群の多様性と機能の推定を行った。

【方法】沖縄県糸満市で生産された市販モズクおよび同県本部町の天然モズクを藻体サンプルとして用いた。高収率DNA抽出法の確立には、抽出キットの種類、抽出に用いるビーズの粒径、クロロホルム・イソアミルアルコール (CIAA) 処理の有無および実施回数等を検討した。メタ 16S 解析に用いる標的領域としては、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域と V5-V6 領域を比較検討した。シーケンシングには MiSeq (イルミナ社) を用いた。

【結果・考察】植物用と土壌用の両DNA抽出キットの標準プロトコルを用いてモズクメタゲノムDNAを抽出したところ、モズク共存細菌群の解析に不十分なDNA量しか得られなかったため、DNA抽出法を最初に確立することとした。ビーズビーティングの条件およびCIAA処理のタイミングと回数を検討して植物用キットの標準プロトコルと組み合わせた結果、DNA収量が標準プロトコルの約4倍に向上し、モズク共存細菌群の解析が可能となった。本方法により得たモズクメタゲノム中の微生物の多様度は、収率が比較的低い他の方法で得たメタゲノムDNAのそれより高いことが、メタ 16S 解析により判明した。以上から、本DNA抽出法は多様な微生物を検出可能な優れた方法であると評価できた。次に、本方法で得たメタゲノムDNAをショットガンシーケンス解析したところ、モズクには少なくとも約400種もの細菌が共存していることが示唆された。現在、ショットガンメタゲノムのデータに基づいてモズク共存細菌群の機能ポテンシャルの評価を進めるとともに、ショットガン解析の結果に比較的近い菌種組成データが得られるメタ 16S 解析プロトコルを検討している。

02-25

一細胞自家蛍光シグネチャーに基づいた細胞集団の不均一性ダイナミクス

○平山 智弘¹, 高部 響介², 野村 暢彦^{2,3}, 八幡 稜^{1,2}

¹筑波大・院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境, ³筑波大・微生物サステナビリティ研究センター

E-mail: hirayama.tomohiro.sg@alumni.tsukuba.ac.jp

遺伝的に均一な細胞集団内であっても、細胞の間には驚くほどの表現系の不均一性が生じていること明らかになりつつあり、例えば遺伝子発現や増殖速度が一細胞ごとに異なることが明らかになっている。こうした表現系の不均一性は、環境変化に備えた微生物の生存戦略として能動的に作り出されている場合や、あるいは微小環境の違いなどによって生じる場合があることなどが示唆されている。一方で、こうした表現系の不均一性が、進化的系統ごとどのように異なるのか、同じ種でも時間変化によって集団内の不均一性が変化するかといった体系的な知見は非常に限られている。こうした背景には、これまで不均一性の評価には一細胞トランスクリプトーム解析など手間と時間のある手法しか利用できなかったことがある。

そこで我々は「自家蛍光シグネチャー」という新しい細胞の表現型の指標を用いて、生育環境の違いや時間変化が細胞集団の不均一性に与える影響を定量化した。自家蛍光とは、細胞内の生体分子が発する微弱な自家蛍光であり、様々な生理状態を反映することが知られている。自家蛍光を表現型の指標とすることで、レポーターの挿入など侵襲的な処理が必要なくなり、一細胞トランスクリプトーム解析などと比べても圧倒的にシンプルに細胞間の性質の違いを定量的に評価できる。我々の研究グループはこれまでに、細胞集団を顕微鏡観察と画像解析、機械学習を組み合わせ、多様な自家蛍光を「一細胞ごとの自家蛍光シグネチャー」として解析する技術、CRIF (特許第6422616号)を開発している。

CRIFによるクローナルな集団内での表現型の不均一性の定量的評価を行うにあたり、*Escherichia coli*および*Pseudomonas aeruginosa*をモデル生物とした。まず、細胞増殖における経時的な不均一性の時間変化を調べるために、経時的に自家蛍光シグネチャーを取得・解析した。その結果、*E. coli*および*P. aeruginosa*のいずれも増殖段階によって異なる不均一性を有していた。特に、*E. coli*においては対数増殖期から定常期にシフトする時点で不均一性が増加し、定常期になると不均一性が小さくなる様子が見られた。この結果は自家蛍光シグネチャーの不均一性は時間的に一定でなく、ダイナミックに変化するものであることを新たに示すものである。本研究は、CRIFが様々な種類の微生物や条件における集団の不均一性の体系的理解を進める研究の青写真となることを示した。

02-26

Pseudomonas sp. LAB-08 株由来増殖抑制物質に対する大腸菌の代謝スイッチングによる適応機構

○本荘 雅宏¹, 鈴木 研志¹, 天野 光喜², 田代 陽介², 二又 裕之^{1,2,3}

¹静大院・自然, ²静大・工, ³静大・グリーン研

E-mail: honjo.masahiro.17@shizuoka.ac.jp

当研究室では環境微生物の一種である*Pseudomonas* sp. LAB-08株が他の微生物の増殖を抑制する物質を生産することを発見した。これまでに増殖抑制物質は水溶性の中分子量の物質であることが示唆され、様々な微生物種の増殖に影響を与えることが確認されている。また、大腸菌は増殖抑制物質によって一時的に増殖が抑制されるものの、その後再び増殖が復活する。さらに大腸菌の一遺伝子欠損ライブラリであるKEIOコレクションを用いた増殖抑制物質に対する耐性株のスクリーニングから解糖系および糖新生の抑制が推測されている。そこで、本研究では増殖抑制物質の作用機序を推定しそれに対する大腸菌の適応機構の推測および増殖抑制物質同定のための精製を行った。

まず、作用機序の解析のために*Escherichia coli* BW25113株を用いてグルコースを炭素源とし解糖系を駆動した場合および酢酸アンモニウムを炭素源とし糖新生を駆動した場合における増殖抑制物質の影響を評価した。その結果、解糖系を駆動した場合には一時的に増殖が抑制されるものの、その後増殖が復活し適応を示した。一方、糖新生を駆動した場合には増殖の復活は確認されなかった。そこで、グリセルアルデヒド3-リン酸からホスホエノールピルビン酸までの4段階の代謝について、それらの遺伝子転写を解析したところ、1,3-ジホスホグリセリン酸から3-ホスホグリセリン酸へ変換する酵素遺伝子 pgk の転写量が著しく抑制されていた。このことから増殖抑制物質による pgk 遺伝子の転写抑制、あるいはこの上流の代謝を担うGapAの酵素活性阻害が推測された。さらに大腸菌は上記代謝経路を介さないペントースリン酸経路のグルクロン酸からピルビン酸につながるエントナー・ドウドロフ経路に代謝を切り替えることで、増殖抑制物質に適応していることが示唆された。

次に、増殖抑制物質の構造決定を進めるため、LAB-08株培養上清を回収し濃縮、脱塩を行ったのちODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにてメタノール濃度を変化させたグラジエント分析により分画を行った。分画溶液を用いて増殖抑制活性試験を実施し、活性が確認された分画を質量分析計にて分析を行ったところ、複数のピークが確認された。現在、増殖抑制物質の更なる精製方法を検討中であり、今後精製された増殖抑制物質を用いてNMR解析を実施し物質の同定を図る予定である。

02-27

ソルガム由来 *Bradyrhizobium* 属細菌株の窒素固定とタンパク質分泌系の多様性

○原 沙和¹, 原 新太郎¹, 菅原 雅之¹, 森川 峻志¹, 米田 淳一², 徳永 毅², 南澤 究¹

¹東北大・院生命, ²(株)アースノート

*Bradyrhizobium*属細菌は根粒菌として知られているが、森林土壌や非マメ科植物の根にも普遍的に分布しており、ダイズ根粒菌とは系統的にも機能的にも異なる。森林土壌の*Bradyrhizobium*属細菌は芳香族化合物分解系を有するが、窒素固定能と根粒形成能は見出されない。非マメ科植物根に内生する*Bradyrhizobium*属細菌は窒素固定能の有用性からイネ科作物(イネ、サトウキビ、ソルガム等)を対象に分離され、一般に窒素固定を行うが、マメ科植物への根粒形成能を欠いていた。しかし、ソルガムからは一部で根粒菌に近縁な株が分離され、*Bradyrhizobium*属細菌の土壌-植物生態系における多様な生存戦略が考えられた。本研究はソルガムに注目し、内生する*Bradyrhizobium*属細菌のゲノム解析により、その機能的多様性と特性を明らかにすることを目的とした。圃場栽培ソルガム根から、ポリミキシンB耐性や根粒形成能を用いて*Bradyrhizobium*属細菌を選択的に分離した。分離株について根粒形成能、自由生活下における窒素固定能、ITS配列による系統関係を調査した。さらに代表株のドラフトゲノムを決定し、MAPLE(Metabolic And Physiological potential Evaluator)を用いて機能遺伝子の保存性を比較した。ソルガム根から44株の*Bradyrhizobium*属細菌が分離され、根粒形成株(Rh: 38株)、自由生活下で窒素固定活性を示す株(Fd: 3株)、窒素固定活性のない株(Nd: 3株)に分類された。系統解析ではRhは*B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. ottawaense*に、Fdは*B. oligotrophicum*や*Bradyrhizobium* sp. S23321に近縁であった。Ndは*B. ottawaense*に近縁で、*B. ottawaense*クレードはRhとFdの両者を含んでいた。代表株におけるゲノム機能解析の結果、タンパク質分泌系遺伝子の保存性の相違が見出された。特に、他細菌や真核細胞を死滅させるタンパク質を分泌することで知られているVI型タンパク質分泌系(T6SS)の有無は系統関係に依存しており、*B. japonicum*, *B. diazoefficiens*は保持していたが、*B. ottawaense*は完全に欠いていた。*B. ottawaense*は根粒形成能があるにも関わらず、これまで日本でダイズ根粒から分離された例はない。以上の結果から*Bradyrhizobium*属細菌におけるT6SSが他細菌との競合力や土壌-植物系における生息域の分化に影響している可能性が考えられた。

02-28

Formation of cooperative metabolic network is constructed by chemically mediated interspecies interaction

○Jabir Mohd Din¹, Tomoka Nishimura², Ayaka Minuora², Kenshi Suzuki², Masahiro Honjo², Koki Amano², Yosuke Tashiro^{1,2}, Hiroyuki Futamata^{1,2,3}

¹Grad. Sch. of Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ.,

³Res. Inst. of Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.

E-mail: abdrahmanjabir@gmail.com

Understanding interspecies interaction is the key in manipulation of complex microbial ecosystem. Regulation of metabolite secretion can strongly maintain such complexity in ecological processes. However, it remains unclear chemical mediators can be a determinant of coexistence and provides new metabolic dependencies that beneficial for bacterial growth populations. This study aims to clarify how two different species coexist in a cooperative interaction involving the phenol degradation. *Comamonas testosteroni* strain R2 and *Stenotrophomonas* sp. strain Y was employed to elucidate essential mechanisms in constructing a microbial stability, a continuous chemostat fed with phenol as a sole carbon and energy source. Coexistence of the phenol degradation capability of the strain R2 was found only in the presence of a non-phenol degrader strain Y. Real-time qPCR analysis showed that population densities of strains R2 and Y were maintained with $8.0 \pm 1.1 \times 10^8$ copies mL⁻¹ and $2.2 \pm 0.9 \times 10^8$ copies mL⁻¹ respectively. These results suggested that strain R2 produced self-inhibiting metabolites and in return, strain Y utilized them as essential resources, leading to stable coexistence on phenol. Different methanol fractions of strain R2 supernatants was extracted using C18 silica gel based solid phase cartridge and tested for the highest inhibition activity for compound purification. The highest inhibitory activity was detected in 10% methanol fraction, suggesting the presence of self-inhibiting compound. The H₂O fractionated strain R2 supernatant was further analyzed by using gradient HPLC. The effect of the H₂O-fraction on kinetic parameters for the phenol and catechol of strain R2 were investigated. These results suggested that the relationship between strains R2 and Y was constructed via cooperative interaction and served as a basis understanding of metabolite leakage phenomena underlying the functionality of metabolic network in microbial communities.

02-29

Mitigating N₂O emissions from agricultural soils by fungivorous mites○申 浩洋¹, 白鳥 豊², 太田 沙由理², 増田 曜子¹, 妹尾 啓史^{1,3}¹東大・院農, ²新潟・農総研, ³東大・微生物連携機構

E-mail: hoyhn.shen@gmail.com

Nitrous oxide (N₂O) is an important long-lived greenhouse gas and ozone-depleting substance. Agricultural soils are the largest anthropogenic sources of global N₂O emissions. N₂O emissions from soils are primarily the results of the enhanced N₂O-producing microbial processes in the soil after fertilizer application, including denitrification and nitrification of bacteria, archaea, and fungi. Thus, suppressing the growth or the N₂O-producing processes of these microbes should be the key to mitigate N₂O emissions. However, there are many difficulties to do these works at a field-scale so that mitigating N₂O emissions globally is still a big challenge so far. Here we show that fungivorous mites, fungal grazers widespread in most of the dryland agroecosystems, can be employed to suppress the growth of the N₂O-producing fungi and accordingly mitigate N₂O emissions from agricultural soils. We found fungivorous mites had considerable abilities to consume N₂O-producing fungi, and the increased fungivorous mites in soils could decrease the fungi abundances and accordingly decrease the N₂O emissions. Meanwhile, we found an easy way, applying coconut husk, an agricultural waste, to the soil, to increase the fungivorous mites in the farm, and so that decreased the N₂O emissions at a field-scale. These findings suggest a biological control technique for the mitigation of N₂O emissions, which is cheap, natural, and helpful for alleviating the pressures of solid waste disposal in tropical countries. Our study points out that N₂O-producing microbes, which are ubiquitous in the soil, can be controlled by their also ubiquitous ecological consumers. We anticipate this study to be focused as an ecologically based novel strategy for the mitigation of soil N₂O emissions.

This research was supported by grants from the Project of the NARO Bio-oriented Technology Research Advancement Institute (Research program on development of innovative technology).

02-30

イネ根圏環境を再現した新規試験管培養系を使用した*Klebsiella oxytoca* NG13 と*Azospirillum lipoferum* FSの窒素固定の動態解析

○吉留 大輔, 近藤 佐紀, 鶴沼 廣太郎, 日高 真誠

東大・院農

E-mail: babum.babuc.babub@gmail.com

【目的】水田に投入される化学窒素肥料の削減法の一つとして、当研究室では、イネ栽培時の追肥部分を生物窒素肥料で置き換えることを目指している。一般にイネ根圏での窒素固定活性はさほど強くないとされてきた。しかし、当研究室の研究では、C源資化性の異なる2種類の窒素固定細菌*Klebsiella oxytoca* NG13と*Azospirillum lipoferum* FSを追肥時期に接種したイネの籾収量は、無接種のものより2割増加した。そこで本研究では、イネ根圏環境を再現した新規試験管培養系を構築することで、NG13株とFS株が発揮する本来の窒素固定活性の測定を目指した。【方法と結果】窒素固定活性の測定には、液体Rennie培地を用いるバッチ培養が汎用されてきた。この方法でNG13株とFS株を混合培養すると、NG13株は数日でC源を消費しつづけて窒素固定活性を発揮しなくなった。また、NG13株の混合有機酸発酵で培地pHが低下し、FS株の増殖が阻害された。そこで、イネの根が1日に分泌するC源を含むRice培地を考案した。まず、この培地でNG13株を液体培養し、1日分のC源を毎日添加した(培養系1)。すると、窒素固定活性が2週間程度(追肥の肥効期間と等しい)持続したが、培地pHの低下は改善されなかった。そこで次に、半透膜内のRice液体培地にNG13株を封じ、これをRice液体培地に浸して培養する方法に変え、この外側の液体培地を毎日交換した(培養系2)。すると、培養液の酸性化が緩和され、NG13株の窒素固定活性は培養系1より5倍に増大した。さらに、培養系2の半透膜を人工鉱物繊維であるロックファイバーに換えて培養系2と同様に培養した(培養系3)。すると、NG13株はロックファイバー上にバイオフィームを形成し、窒素固定活性は培養系2より2倍に増大した。この培養系3を新規試験管培養系と名付けた。新規試験管培養系でNG13株とFS株を混合培養すると、相加的な窒素固定活性が発揮された。最後に、新規試験管培養系に水田土壌細菌叢を構築した。水田土壌細菌の混合液を、新規試験管培養系で数日間培養し、そこにNG13株とFS株を後から添加したところ、系全体の窒素固定活性が2~3割増大した。【結論】以上の結果より、NG13株とFS株がイネ栽培時の追肥として十分な窒素固定活性を発揮できる可能性を示せた。また今後、イネ根圏に生息する窒素固定細菌全般においても、新規試験管培養系を用いることで既知の窒素固定活性とは全く異なる活性を見出せるであろう。

P1-01

同位体分析による落水後の水田における N₂O 生成反応の解明とバイオ炭による N₂O 削減の検討

○伊藤 有里子, 細見 正明, 寺田 昭彦, 利谷 翔平

東京農工大・院工

E-mail: yito@st.go.tuat.ac.jp

【背景・目的】亜酸化窒素 (N₂O) は強力な温室効果ガスであるとともにオゾン層破壊物質である。水田では落水後に突発的に多量の N₂O が発生するが、生成反応や削減方法は明らかにされていない。N₂O 生成反応の推定については、窒素同位体比が生成反応によって変化することを利用した手法が報告されている。さらに、土壌の N₂O 削減方法については、近年、バイオ炭の施用が目ざされている。しかし、バイオ炭の施用による N₂O 削減効果が確認されている一方で、N₂O が増加したという報告もあり、どのような条件下で N₂O 削減効果が現れるのかは明らかになっていない。そこで本研究では、まず量子カスケードレーザーにより連続的に N₂O 濃度と SP 値 (Site Preference) を計測可能な N₂O 同位体比アナライザーを用いて落水後突発的に生成する N₂O の生成反応を調査した。その上で、水田での施用を想定し、土壌が酸化的な条件下と還元的な条件下のそれぞれにおいて、バイオ炭による N₂O 削減効果を評価した。

【実験方法】水田土壌を充填した土壌カラムを調製し、100 kg N ha⁻¹の窒素負荷量で (NH₄)₂SO₄ を添加した後、落水させた。実験は落水方法を変えて2回行い、1回目は土壌浸透無し (自然蒸発)、2回目は浸透速度 1 cm/day で行った。ヘッドスペースに純空気を 0.2 L/min で流し、N₂O 同位体比アナライザーに導入して N₂O 濃度と SP 値を測定した。なお、異なる N₂O 濃度の標準ガスをアナライザーに導入したところ、1.5 ppm 以下で SP 値を安定的に測定できなかったため、1.5 ppm 以上の N₂O 濃度の SP 値を評価した。

【結果・考察】ヘッドスペース中の N₂O 濃度は落水後に上昇し、N₂O の生成が確認された。N₂O 濃度が 1.5 ppm 以上において、土壌浸透がないカラムの SP 値は脱窒によって生成される報告値と近い -5 ~ 10% を示し、土壌浸透を行ったカラムでは硝化 (ヒドロキシルアミン酸化) によって生成される報告値と近い 30 ~ 40% を示した。土壌浸透がない場合では土壌水分量が高く還元的な状態が続いたため脱窒が促進され、土壌浸透を行った場合では土壌に酸素が入り込みやすくなり酸化的な状態になったため硝化が促進されたと推測された。以上より、土壌浸透速度の違いにより生成反応が変化する可能性が示唆された。バイオ炭による N₂O 削減の検討はポスターにて発表する。

P1-02

微生物有害元素代謝の多様性：嫌氣的アンチモン酸化細菌群の代謝機構と系統分布

○大久保 公貴¹, 山下 葉里子¹, 濱村 奈津子^{1,2}

¹九州大・院 システム, ²九州大・院理

E-mail: okubo.tomotaka.251@s.kyushu-u.ac.jp

レアメタルの一種である周期表第 15 族のアンチモン (Sb) は、同族元素のヒ素と同様に生体毒性元素であり、近年、産業利用の増加やそれに伴う鉱山活動による環境への放出が問題となっている。アンチモンは環境中では主に無機態の 3 価 (SbIII) もしくは 5 価 (SbV) の状態で存在し、3 価型はより高い生体毒性を示すが、溶解度が低く吸着性が高いことが報告されている。あらゆる生物種の中で唯一微生物は、これら環境中に広く分布している有害元素への耐性のみならず、エネルギー源として利用するより積極的な代謝機構も発達させてきた。しかし、これまでにヒ素以外の有害元素の生物代謝に関する知見は限られており、ヒ素と同族元素であるアンチモンの微生物代謝についても未解明な部分が多い。そこで本研究では、新規アンチモン代謝菌群の分離培養による同定とゲノム解析を実施し、有害元素代謝微生物の代謝機構と系統分布を明らかにすることを目的とした。高アンチモン環境試料を接種源とし、酸素条件や炭素源等の異なる条件で集積培養を実施した結果、通性嫌気性アンチモン酸化能を示す α -Proteobacteria 綱 *Mesorhizobium* sp., β -Proteobacteria 綱の *Hydrogenophaga*, *Cupriavidus* spp. を分離同定した。さらに、*Mesorhizobium* 株と *Hydrogenophaga* 株のゲノム解読の結果、両者とも先行研究で同定されているアンチモン酸化酵素 (AnoA) の類似配列は保有していなかったが、これら 2 株は相同性の高いプラスミド配列を共有しており、このプラスミド上には、ヒ素酸化還元酵素グループの属する DMSO リダクターゼファミリーの遺伝子が確認された。これまでに、ヒ素酸化細菌によるアンチモン酸化が報告されているが、本研究で同定された 2 株とも同族元素のヒ素は代謝しないことから、異なるアンチモン代謝機構を有する可能性が示唆された。これらの結果は、有害元素ヒ素の微生物代謝と同様に、アンチモンの代謝機構も系統的また生理生態的に多様な Proteobacteria 門の多系統に分布していることを示すとともに、環境中で SbIII の SbV への酸化はアンチモンの溶出を促進することも懸念されることから、今後これらアンチモン代謝細菌の環境分布や環境動態への影響の評価が望まれる。

P1-03

土壌抽出液培地を用いたMPN計数を経由した多様な新規アンモニア酸化アーキアの実験室培養

○梅澤 千陽¹, 黒岩 恵¹, 橋本 知義², 磯部 一夫³, 諏訪 裕一¹

¹中央大・院理, ²農研機構, ³東京大・院農

E-mail: a14.7d4h@g.chuo-u.ac.jp

【はじめに】 選択的でない培地を使用して、積極的に集積培養しないとすれば、どんな硝化微生物 (AOM) が培養されるか? 土壌抽出液を基礎培地として土壌中のAOMをMPN計数したところ、選択的な無機培地による計数値を上回り、アンモニア酸化アーキア (AOA) が優占した。AOAは無機培地でほとんど培養されず、AOAの培養で土壌抽出液が有効な可能性が示唆された (Umezawa *et al.*, 2018, JSME)。では、どれほど多様で新規なAOAを培養できるか? 【試料】 20年以上有機農法を継続しているつくば市の畑地から、表層 10 cmの土壌を採取した (pH, 7.48; 含水率, 25%)。【実験系】 培地; 4種類の培地を調整した。土壌抽出液 (TOCは277.4 ppm, NH_4^+ , NO_2^- , および NO_3^- は、それぞれ, 4.25, 7.63, 72.5 ppm) のpHを7.6あるいは6.5とし、¹⁵N標識した硫酸あるいは尿素を1.5 mM-¹⁵N添加した。培養; 土壌を10倍ずつ系列希釈し、5希釈段階を5連で各培地に接種し、25°C, 8週間培養した。硝化によって生産された¹⁵ NO_2^- と¹⁵ NO_3^- は、¹⁵Nトレーサー法と脱窒菌法を組み合わせで検出・定量した。AOAの同定; MPNで硝化陽性と判定された培養中のAOAは、AOAに特異的なアンモニア酸化酵素 (amoA) をターゲットにPCRで検出した。アンプリコンの塩基配列を決定し既知のamoA配列と比較した。【結果と考察】 全100培養のうち、74培養で硝化が検出された。無作為に選んだ56培養中、14培養でAOA陽性であった。残りの42培養中AOBが検出されたのは5培養で、他37培養はどちらも検出されなかった。AOA陽性の内13培養について、PCR産物の塩基配列をクローニングせずに読むことができ、単一のAOA種が優占した可能性が示唆された。これら13培養中の優占AOAは、98%以上の相同性を基準として、6 OTUに類別された。それらのうち、1 OTUは既知株と100%相同であったものの、残りの5 OTUはいずれも新規性が明確で、既知株との相同性は84.94 ~ 94.72%であった。13培養中5培養は7代にわたり継代培養でき、新規なAOAの分離源とできる可能性があるものと考えられる。

P1-04

Water-in-Oil DropLet (WODL) を用いたペプチダーゼ高生産微生物のスクリーニングと菌叢解析

○本間 宣行¹, 中村 彰宏¹, 鈴木 義之², 志田 洋介¹, 小笠原 渉¹

¹長岡技科大・院工, ²長岡高専・専攻科

E-mail: s141080@stn.nagaokaut.ac.jp

Water-in-Oil DropLet (WODL) とは油中に微小水滴が分散した系であり、広義にはエマルジョンを指す。近年、微量の流体を扱う技術の進歩により、均一で安定なWODLの作成とその内部での長時間の細胞培養が可能になった (W. Liu *et al.*, Lab on a chip, 2009)。また、WODL内に蛍光基質を封入することで微生物が保持する酵素活性の検出や、数十万を超えるWODLの高速分離が可能となっている。これらの特徴を生かし、WODLは微生物スクリーニングに応用されている (Y. Qiao *et al.*, Lab on a chip, 2018)。しかし、その例は少ない上、市場規模の大きいペプチダーゼ (プロテアーゼ) に対するスクリーニング系は未だ確立されていない。そこで我々は、ペプチダーゼを標的とすることで、新規ペプチダーゼ生産微生物の単離を目指し、さらにWODLを用いた高効率なスクリーニングの有用性を提示する。本研究では、ペプチダーゼ高生産菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 をモデル微生物として、スクリーニング構築のための基礎検討をした。さらに、環境中からペプチダーゼ活性が高い微生物種を網羅的に解析することで、単離が期待される微生物種を同定した。

最初に、WODLを用いたスクリーニング系を用いて、モデル微生物の特異的分離を試みた。ペプチダーゼ高生産微生物 *P. mexicana* WO24 と低生産 *Escherichia coli* を別々のWODLに封入して混合培養を行い、蛍光基質によりペプチダーゼ活性を検出した。On-chip Sort (On-chip biotechnologies 社) による解析の結果、*P. mexicana* WO24 が増殖したWODL内で *E. coli* よりも高い酵素活性が検出され、蛍光に基づいてペプチダーゼ高生産菌である *P. mexicana* WO24 の分離に成功した。

次に、環境微生物に対するスクリーニングを実施した。土壌中から微生物を抽出し、蛍光基質を含む培地に懸濁し、WODLを作成した。24時間の培養後、WODL内で十分な菌体の増殖とペプチダーゼ活性による蛍光を確認した。そこで、45万のWODLから蛍光強度が高い上位1%を分離し、菌叢解析によりペプチダーゼ活性が高いと予測される微生物種を同定した。その結果、高活性を示した微生物種の中にはペプチダーゼ生産能力に優れた *P. mexicana* WO24 の類縁種が多数存在した。本研究により、我々はWODLを用いたスクリーニング系の基盤を構築し、菌叢解析の結果からペプチダーゼ高生産微生物の新規単離が期待されることを明らかにした。

P1-05

X線マイクロ/ナノCTによる深海海底土壌の微生物細胞可視化 画像処理によるアプローチ

○比嘉 勝之¹, 山村 雅幸¹, 諸野 祐樹²

¹東工大・生命理工, ²海洋研究開発機構

E-mail: higa.k.ab@m.titech.ac.jp

環境中に生息する微生物およびその生息環境を立体的に可視化することは、様々な微生物反応の「場」を観察するために有効な手段である。この「場」の観察を通し、微生物細胞の分布、微生物と生息環境との相互作用といった、微小な生命現象の理解が深まることが期待される。近年、X線を利用したCT (Computed Tomography: コンピュータ断層撮影) によって、サブマイクロメートルレベルの空間分解能で試料の観察を行うことが可能になっており、微生物レベルの極小物質の分布を可視化することも可能になってきている。しかし、主に軽元素で構成される微生物細胞は、X線が容易に通過するため、十分なコントラストをもって可視化することができなかった。

海洋研究開発機構の諸野研究員らによって、特定元素により微生物細胞を染色後、CT撮影を行うことで微生物の可視化をより効率的に行う試みがなされている。さらに、X線吸収係数が急激に変化する吸収端前後のエネルギーでCT画像を取得し、これをコンピュータ上で処理することで、染色された微生物細胞のみを可視化することが可能であることも示唆された。

しかし、この吸収端前後のエネルギーで取得されたCT画像間には、「位置的なズレ」が生じていることが判明した。そしてこの位置的なズレは、微生物細胞のみを可視化する処理を行う際に問題となっていることもわかった。本研究では、この位置的なズレをコンピュータ上での画像処理により解消し、より精細に微生物細胞の分布を可視化することを試みている。

P1-06

Alicyclobacillaceae 科の新規好熱・好酸性細菌の単離と特徴づけ

○井奥 有希, 森 美穂, 城島 透

近畿大・院農

リグノセルロース系バイオマスから燃料や化学品を生産するバイオリファイナー (BR) は、地球温暖化対策技術として期待されている。一方、現在のBRには種々の技術的課題が残されており、石油から製造した同等品よりも製造コストが高く、実用化はそれほど進んでいない。リグノセルロース系バイオマスを原料とした変換プロセスでは、糖化酵素によりバイオマスから生成した糖類は、微生物により各種の有用物質に変換される。この時、糖化反応の最適条件は、およそ50℃、pH 5であるため、一般には糖化工程と発酵工程は分離して実施される。仮に発酵工程を糖化反応の最適条件で実施できれば、並行複発酵が可能となり、製造コストを低減できる。そこで本研究では、リグノセルロース系バイオマスの並行複発酵による効率のよいバイオプロセスの構築を目指し、好熱・好酸性細菌TP075株を土壌から単離した。TP075株の16S rDNA配列を取得して系統解析を行ったところ、最近縁種として*Tumebacillus*属の中では*T. solii*に対して92.5%、*Effusibacillus*属の中では*E. consociatus*に対して92.7%の相同性を示した。また、分子系統樹では、TP075株と99%程度の相同性を示す未培養細菌は、*Tumebacillus*属、および*Effusibacillus*属細菌とは独立したクラスターを形成していた。次に、生理学的性質を検討したところ、TP075株の最適培養温度と培養pHは、それぞれ47.0℃、4.0-5.0であり、炭素源としてグルコースやキシロースなどを利用可能であった。また、主要な脂肪酸組成は、iso-C_{15:0} (21.7%) と anteiso-C_{15:0} (18.9%) であった。これに対して*Tumebacillus*属細菌の最適培養条件は、培養温度が28 ~ 37℃、pHは中性付近であり、また、脂肪酸はiso-C_{15:0}の割合が最も多かった。一方、*Effusibacillus*属細菌の最適培養条件は、培養温度は30-50℃、pHは中性付近であり、最近縁種である*E. consociatus*の脂肪酸組成は、anteiso-C_{15:0}が最も多かった。以上の結果より、TP075株は新属新種の細菌と考えられた。

P1-07

運動性乳酸菌の選択分離法の構築と環境中からの分離

○真崎 志桜里¹, 田中 悠二², 柳田 藤寿², 乙黒 美彩²

¹山梨大・地域食物, ²山梨大院・ワイン研

【目的】乳酸菌は一般的に非運動性であるが、近年Lactobacillus属のいくつかの種で運動性が報告されている。しかし、運動性乳酸菌の既知種が少なく、運動性の機能において未解明な点が多いため、運動性乳酸菌の研究開発および産業利用はほとんど行われていない。本研究では化学走性を利用した運動性乳酸菌の選択分離法を構築し、自然界及び発酵食品中からこれらの菌群を効率的に分離することを目的とした。【方法・結果】選択分離法の基盤に毛細管捕集法を用いた。初めに毛細管捕集法の改良として充填する誘引剤の選抜を行った。次に、運動性乳酸菌の分離報告の多いワイン醸造環境を主な分離源として、運動性乳酸菌の分離を行った。分離乳酸菌の同定を16S rRNA シーケンス解析にて行うことで分離方法の有効性を検討した。誘引剤としての効果をアミノ酸水溶液やYeast extract水溶液など10種類について運動性乳酸菌の既知種2株に対する誘引剤の評価試験を実施した。その結果、フェネチルアルコール、Yeast extract水溶液、リン酸緩衝液が有効であることを見出した。これらの誘引剤による改良毛細管捕集法を、土壌、植物、ワイン発酵もろみなど計24サンプルに適用し、運動性乳酸菌の分離を試みた。分離株計317株中14株に運動性が認められ、16S rRNA シーケンス解析の結果14株はすべてLactobacillus nageliiと同定された。

P1-08

白神山地のブナから分離した新規Chloroflexi門Ktedonobacteraceae科細菌brp13株に関する研究

○大坂 彩瑛, 殿内 暁夫

弘前大・院農

1993年に世界自然遺産に登録された白神山地は人為的影響をほとんど受けていない原生的なブナ天然林が世界最大規模で分布している。演者は白神山地に生育するブナの根圏から細菌株brp13を分離し、Chloroflexi門Ktedonobacteraceae科の新属・新種と推定されること、植物成長促進作用があること、子嚢形成能を有することなどを昨年度の本大会で報告した。今回、brp13株の化学分類学的解析・ゲノム解析を行うとともに、分離源であるブナに対する植物成長促進能についての解析を行ったので報告する。brp13株は細胞脂肪酸・キノン・リン脂質・細胞壁アミノ酸・糖の化学分類学的特徴のうち、特に細胞壁アミノ酸および糖の構成に最近縁種Dictyobacter aurantiacus S-27^Tとの明確な差異が認められた。ドラフトゲノム解析によりbrp13株のゲノムサイズは8.94 Mbで推定遺伝子数は7,257、KEGGアノテーションでは炭水化物の代謝に関する遺伝子の数が多いことが予測された。ブナ種子を滅菌土壌と滅菌土壌にbrp13株に混和した土壌に播種したところ、発芽開始時期や成長初期には大きな差異は見られなかった。しかし、滅菌土壌のブナが播種後約50日で枯死した後もbrp13株を含む土壌のブナは生残したことから、brp13は自身の有するIAA生産能や抗細菌・真菌増殖能によりブナの生育に正に関与する可能性が示唆された。以上の結果に基づき、brp13株を基準株とした新属・新種“Ktedonosporangium fagi”を提案する予定である。

P1-09

講演取下げ

P1-10

難培養性微生物*Nitrospira*の覚醒シグナルに応答する遺伝子の解明

○木村 弥実¹, 木村 聡美¹, 寺地 裕康², 村上 千穂^{1,3}, 木村 康浩¹, 青井 議輝³

¹安田・薬, ²廣大・院工, ³廣大・院統合生命

環境中の多くの微生物は難培養性であることが知られている。その事実は微生物学において本質的に重要な課題であるにもかかわらず、なぜそれらが培養できないのか、つまり難培養性という性質についての本質的な理解は全く得られていない。一方で、門レベルで難培養性を示す*Nitrospira*は、亜硝酸酸化反応を主に担う重要な微生物種であるにも関わらず、分離に成功した例は極めて少ないが、我々は新規な手法を適用することで、*Nitrospira*の純粋菌株を獲得している。本研究では、難培養性微生物*Nitrospira*をモデルとして用いて、その増殖制御機構を解明することを目的とした。

難培養性微生物*Nitrospira*は、増殖と死滅以外に休眠（生きているが増殖しない）といえる状態にも移行することが分かってきた。休眠状態の*Nitrospira*は、エネルギー源である亜硝酸を供給しただけでは増殖を開始しないが、自身の培養上清も同時に加えると速やかな増殖開始が見られる。したがって、この上清中に休眠状態の*Nitrospira*に作用する覚醒シグナルが存在することが予想されているが、それがどのように作用しているかは全く明らかになっていない。そこで、休眠・増殖・覚醒状態の*Nitrospira*のRNAを抽出して次世代シーケンスにより total RNA-seq の解析を行った。

解析の結果、*Nitrospira*の推定機能遺伝子を含む4105個の各状態の遺伝子発現状態が明らかとなった。その内、環境の変化に応答して遺伝子の発現が変化する機構として、RNAポリメラーゼのシグマファクターと二成分制御系を担うヒスチジンキナーゼに着目した。*Nitrospira*の17個のシグマファクターの内、休眠時に特異的に発現するシグマファクターを1個に絞ることができた。また、13個のヒスチジンキナーゼの内、2個のヒスチジンキナーゼが休眠からの覚醒時に発現していることが分かった。これらの結果から、飢餓からの休眠時に特異的なシグマファクターと、覚醒時に働くヒスチジンキナーゼ遺伝子を絞り込むことができた。

P1-11

なぜコロニーを作らないのか？液体培地でしか増殖しない難培養微生物 (*Nitrospira*) にコロニーを作らせる

○田村 淳¹, 寺地 裕康², 村上千穂³, 金田一 智規², 大橋 晶良², 青井 議輝¹

¹ 広大院統合生命, ² 広大院工, ³ 安田 薬

E-mail: m192145@hiroshima-u.ac.jp

環境中の多くの微生物は難培養性であることが広く知られているが、普遍的かつ本質的な理由やメカニズムは全く解明されていない。もしその一端が明らかになれば多くの未培養微生物の培養化につながり、さらには環境中で微生物が増殖を制御している未知なる機構の発見も期待できる。一方で、門レベルで難培養性を示す *Nitrospira* は、亜硝酸酸化反応を主要に担う重要な微生物であるにも関わらず分離に成功した例は極めて少ないが、我々は新規な手法を適用することで、*Nitrospira* の純粋菌株を獲得している。また他の多くの硝化細菌がそうであるように *Nitrospira* は固体培地上でコロニーを形成しない。さらに従来の分離培養法の多くは固体培地上でのコロニー形成を基盤としているため、性質的にコロニーを形成しない微生物は必然的に分離困難と言えるが、その理由はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、難培養性微生物 *Nitrospira* をモデルとして、コロニーを形成しない理由を明かにすることを目的とした。これまでの我々の検討から、*Nitrospira* は休眠状態に陥りやすく覚醒にはシグナル様因子が必要であること、そしてそれが難培養性の一つの原因であることが判明しているが、いったん増殖を始めると液体培地では比較的良好に増殖する。そこで我々はコロニーを形成しない理由について以下の仮説を立てた。1) *Nitrospira* は、自身が産出する特定の代謝 (副) 産物の蓄積により増殖が停止する。2) 固体培地上では、活性のある細胞の周囲にそれらの代謝 (副) 産物が局所的に蓄積するため、コロニーとして視認できるレベルまで増殖しない。したがって、増殖を停止させている代謝 (副) 産物の局所的な濃度を常に低レベルに維持できれば、*Nitrospira* は視認できるサイズのコロニーを形成できるはずである。そこで、本研究では培養中において常に自身の代謝 (副) 産物の拡散・希釈を進行することを可能にした培養装置をデザインした。そして実際にそれを用いて固体培地中で *Nitrospira* を培養したところ、1-2 カ月程度で十分に視認できるサイズのコロニー形成が認められた。以上の結果から、自身が産出するなんらかの増殖阻害 (停止) 物質の菌体近傍における局所的な濃度上昇が *Nitrospira* のコロニー形成を阻害していると示唆された。

P1-12

Polyhydroxyalkanoate (PHA) がシグナル伝達に与える影響の解析

○中島 梨花¹, 森永 花菜², 安田 まり奈¹, 野村 暢彦^{3,4}, 豊福 雅典^{3,4}

¹ 筑波大院・生命環境科学研究科, ² 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門, ³ 筑波大・生命環境系,

⁴ 筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター

E-mail: shima.rinka7@gmail.com

細菌は、自身が産生するシグナル物質を介して、菌体密度依存的に遺伝子発現を調節することが知られている。この機構は Quorum sensing (QS) と呼ばれており、多くのグラム陰性細菌はシグナル物質としてアシル側鎖を持つ N-acyl-homoserine lactone (AHL) を産生する。その側鎖の長さは多様性に富んでおり、短鎖 AHL は拡散性に優れているが長鎖の AHL は疎水性が高く、細胞膜に留まりやすいために伝達されにくいと考えられている。グラム陰性細菌である *Paracoccus denitrificans* は、QS シグナルとして C16-HSL を産生する。C16-HSL は疎水性が極めて高く、水に拡散しづらい。当研究室の先行研究において、本菌は産生した C16-HSL の約 30% を細胞に蓄積することを明らかにした (Toyofuku, et al., 2017, ISME J)。一方で、*P. denitrificans* は窒素などの栄養の欠乏下において細胞質内に Polyhydroxyalkanoate (PHA) を合成・蓄積し、封入体を形成する。PHA とは疎水性の高い高分子ポリマーであり、栄養飢餓時に自身のエネルギー源とすることができる。また、産業面では生分解性プラスチックにも応用されている。蓄積された PHA は細胞質内の 80~90% を占めることから細胞の生理状態、とりわけシグナル伝達を攪乱する可能性がある。しかし、PHA がシグナル伝達に与える影響は解明されていない。そこで本研究では、PHA と QS の関係を明らかとすることを目的とした。窒素制限下と非制限下における *P. denitrificans* の QS 活性と PHA 合成量を調べたところ、PHA 合成量が少ない窒素非制限下では QS が行われていた。その一方で、PHA が多く合成される窒素制限下では QS による遺伝子発現制御がほとんど観察されなかった。しかしながら、この窒素制限下では、QS を行うのに十分な濃度の C16-HSL が細胞に蓄積されており、何らかの理由で QS による遺伝子発現制御が阻害されていることが示唆された。また、PHA 蓄積量が QS に依存して変化することから、活性が低いながらも QS が窒素制限下でも行われていることが示され、新たな QS 制御機構の存在が示唆された。PHA 合成との関連について、現在解析中である。

P1-13

熊本県阿蘇郡の高温地熱水に生息する未培養性アーキアの分子系統

○浅松 克洋, 斉藤 誠, 柳川 勝紀

北九州市立大・院工

E-mail: a9mab001@eng.kitakyu-u.ac.jp

高温地熱水は多種多様な未培養系統群を含む微生物ダークマターの宝庫である。本研究では、これまでに分子生態学的研究例のない熊本県阿蘇郡の高温地熱水を対象とした。熱水試料の温度は93度でpH8.6を示した。沸騰温度に近いにもかかわらず、多くの多様な形態をした微生物が観察され、その密度は 1.5×10^4 cells/mLであった。微生物群集組成は、AquificaeやThermotogaeが7割を占めていたが、新規性の極めて高いアーキア由来の遺伝子配列も取得された。しかしながら、この解析で取得された配列は380bp程度の短い断片であり、詳細な分子系統解析ができないことから、複数のアーキア特異的プライマーセットを用いて16S rRNA遺伝子の全長配列の決定も試みた。増幅できたPCR産物はクローニング法を介して塩基配列を決定した。これにより遺伝子塩基配列情報を約1.8倍まで増やすことに成功した。得られた情報をもとに系統樹を作成したところ、対象配列と最も分岐が近いと推定されるものはNanoarchaeotaであった。しかし、得られた配列はデータベース上の既知配列との相同性が極めて低いことから、門レベルで新規の系統群であると示唆される。

P1-14

地下帯水層に生息する新規微生物群集の遺伝子解析

○内野 正洋¹, 木村 浩之²

¹静岡大・院理・地球, ²静岡大・理・地球

E-mail: uchino.masahiro.15@shizuoka.ac.jp

静岡県中西部から四国, 九州, 沖縄にかけて、付加体と呼ばれる堆積層が分布している。付加体には有機物が豊富に含まれている。また、付加体の地下深部には帯水層があり、メタンを主成分とする天然ガスが存在していることが報告されている。これまでの研究で地球化学的手法および微生物学的手法から、地下帯水層の微生物群集構造や微生物によるメタン生成プロセスが示された。一方で、遺伝子解析を行ったサイトの中で、未知の微生物が高い割合で検出されたサイトも存在した。地下圏や地球全体での物質循環を知るためには、未知の微生物が地下圏でどのような代謝を行い、どの程度物質循環に関与しているか、知見を得ることは重要である。

本研究では、16S rRNA遺伝子の詳細な解析を行い、微生物群集の系統を明らかにし、地下圏での微生物のエネルギー代謝の推定を試みた。静岡県焼津市にある温泉用掘削井YZ-50（深度170 m）と沖縄県那覇市にある温泉用掘削井LSH（深度800 m）でサンプリングを行い、地下帯水層に由来する嫌気性の地下水を採集した。地下水中に含まれる微生物の16S rRNA遺伝子を対象としたクローニング・シーケンシング解析を行い、微生物群集の16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとにBLAST検索を行い、系統樹を作成した。そして、微生物分類群を特定するとともに、地下圏での微生物の代謝を推定した。加えて、16S rRNA遺伝子の塩基配列に含まれるグアニンとシトシンの割合から、微生物の生育温度を推定した。

一連の遺伝子解析の結果、微生物群集は既知の微生物との相同性は84%～93%と非常に低く、*Ca. Altiarchaeum*門などの未培養の微生物分類群や、目および属レベルにおいて新規の微生物分類群であることが示された。この系統解析から地下帯水層で微生物が行っている代謝を推定したところ、発酵や化学合成を行っている可能性が示唆された。また、生育温度を推定した結果、約12℃から約40℃の間であることが推定された。この生育温度に違いがみられた理由は、低温の海水に由来する微生物と、地熱によって温められた地下帯水層の温度に適応した微生物が存在したためであると考えられ、一部の微生物は地下帯水層で高い活性を有すると考えられる。これらのことから、本研究で解析した未知の微生物群集は地下圏で、堆積層中の有機物の分解といった炭素循環に関与していることが示唆された。

P1-15

火山灰を由来とする難培養高度好熱菌の分離の検討

○沖村 マイコ¹, 藤本 遼¹, 奥川 友紀¹, Hidayat Fandi^{1,2}, Mae Bienes Kathrina¹, 田代 幸寛¹, 酒井 謙二¹

¹九大院・生資環, ²IOPRI, Indonesia

【目的】現在、従来の固体培地では生育できない難培養微生物の分離法の開発が必要とされており、顕微蛍光マニピュレータを用いれば、微生物を液体培地から 1 細胞のみ吸引し、液系分離することが可能である。しかし、本技術による難培養高度好熱菌の分離例は多くない。一方、先行研究では、種々の火山灰には高度好熱菌が存在していることが明らかになっているが、固体培地による分離は成功しておらず、難培養高度好熱菌であると考えられている。そこで本研究では、本技術を用いた火山灰からの難培養高度好熱菌の集積条件と分離の検討を目的とした。【方法】Sinabung 山（インドネシア）等で採取した火山灰および高度好熱菌 *Calditerricola satsumensis* YMO81¹ 種を接種し、75℃における集積培養条件（液量及び振とう）を検討し、濁度測定により、最適条件を決定した。確立した条件で培養した集積培養液を用いて顕微蛍光マニピュレータによる液系分離を行った。また、集積培養液より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅したのち、ダイレクトシーケンス解析により、主要細菌を帰属した。さらに、主要細菌の近縁種の培養条件をフィードバックした条件下で固体培地によるコロニー分離を行った。【成績】集積培養条件を検討した結果、液量 5 mL より 200 mL の場合に高い濁度を示した。さらに、静置培養より振とう培養の場合に高い濁度を示した。よって、火山灰に存在する高度好熱菌の集積には、好気条件が適していることが明らかとなった。さらに、本集積培養液のダイレクトシーケンス解析結果、*Calditerricola* spp. (相同性 99% 以上) に帰属され、高純度で本菌が集積されたことが示唆された。ところが、緑色蛍光を指標とする生菌を顕微蛍光マニピュレータにより液系分離を行ったが、1 細胞分離した細菌は増殖しなかった。次に、フィードバック培養条件下では、固体培地でコロニーを形成したことから、集積培養条件と分離条件の検討により難培養高度好熱菌の分離が可能となったことが示唆された。現在、形成したコロニーの解析を進めている。

P1-16

深海の化学合成生態系に優占する共生微生物の糖鎖生物学的性状

○土井 昂大¹, 島村 繁², 矢木 宏和³, 矢木 真穂⁴, 谷中 冴子⁴, 澤山 茂樹¹, 井町 寛之², 高井 研^{2,4}, 加藤 晃一^{3,4}, 中川 聡^{1,2}

¹京都大・院農, ²JAMSTEC X-star, ³名古屋市立大学・院薬, ⁴ExCELLS

E-mail: doi.takahiro.52m@st.kyoto-u.ac.jp

深海底熱水活動域は、高温熱水に含まれる化学物質をエネルギー源とする化学合成独立栄養細菌を基盤とした「化学合成生態系」を育んでいる。現場に生息する多くの無脊椎動物は、特定の化学合成独立栄養細菌と強い共生関係にあり、ほぼ全ての栄養を依存している。深海底熱水活動域に生息する多様な化学合成独立栄養細菌の中でも特に優占する *Epsilonproteobacteria* 綱の微生物は、巻貝や甲殻類といった様々な無脊椎動物に細胞内あるいは細胞外共生することに加え、チムニー構造物や熱水と海水の混合域において自由生活するなど、多様なライフスタイルを有する水素/硫酸化細菌である。深海底熱水活動域に優占する複数の *Epsilonproteobacteria* を対象として全ゲノム解析が行われた結果、少なくともこれまでに解析された全ての深海 *Epsilonproteobacteria* において、近縁の病原性 *Epsilonproteobacteria* (*Campylobacter* や *Helicobacter*) に固有であると考えられてきた病原性関連遺伝子群の 1 つ、N 型糖鎖関連遺伝子群が共通して見出された。病原性 *Epsilonproteobacteria* では、当該遺伝子群の産物でタンパク質を糖鎖修飾し、宿主との相互作用（感染）や環境適応に利用することが知られている。深海 *Epsilonproteobacteria* における糖鎖の役割に関する知見は皆無だが、病原性 *Epsilonproteobacteria* と同様に、深海 *Epsilonproteobacteria* においても、糖鎖が宿主との相互作用（共生）や物理化学的な環境変動の激しい熱水活動域への環境適応に関わっていると考え、深海 *Epsilonproteobacteria* の糖鎖生物学的性状を解析することにした。

本研究では、深海 *Epsilonproteobacteria* の中でも、自由生活型の *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株（分離株）と、それに系統学的に近縁な微生物を含む細胞外共生細菌を対象とし、ヒドラジン分解法により細菌に発現する糖鎖を切り出し、ラベル化・精製の後に種々の質量分析や NMR 法を組み合わせ、その構造を解析した。その結果、細胞外共生細菌において、還元末端にヘキソースやデオキシメチルヘキソースを有する、極めて新規性の高い糖鎖が特異的かつ大量に検出され、糖鎖が共生の鍵分子として機能するという当初の仮説を支持する結果を得た。

P1-17

微生物はなぜ群れを作るのか？：
平板培地実験進化系を用いたBQHの検証○仁平 賢¹, 山本 達也², 平野 彰大¹, 野村 暢彦^{2,3}, 永田 裕二¹, 矢野 大和²¹東北大 院生命, ²筑波大 生命環境, ³微生物サステイナビリティ研究センター

E-mail: s.nihei.tohoku@gmail.com

微生物群集の形成過程を説明するモデルとして、遺伝子機能欠損変異体の出現とその利己的な振る舞いによって群集が自動形成されるとするBlack-Queen-Hypothesis (黒の女王仮説: BQH) が提唱されている。BQHは微生物生態学に定着してきた考え方ではあるが、BQHを直接支持する実験的証拠は未だに乏しい。私たちはBQHの妥当性を検証するため、人為起源の農薬である γ -hexachlorocyclohexane(γ -HCH)を分解する細菌として土壌から分離された*Sphingobium japonicum*クローン集団の実験進化を行った。その過程で、特定の遺伝子機能を失った遺伝系統が出現し、それがそれ以外の系統と集団内で共存し続ける現象が起きるかどうかを調べた。まず染色体領域の欠失を検出するため、*Sphingobium japonicum*の γ -HCH代謝遺伝子である*lin A*の下流に、蛍光タンパク質遺伝子をレポーターとして組み込んだモデル株を作製した。作製した株を、 γ -HCHを唯一の炭素源とする条件、またはグルコースを唯一の炭素源とする条件で、それぞれ5系列の独立した初期クローン集団を平板培地を用いて培養し、その継代培養を行った。その結果、6系列において蛍光タンパク質遺伝子領域の欠失を持つ細胞集団が出現し、その内4系列では欠失を持つ集団と欠失を持たない集団との共存が長期にわたり持続した。この観察結果はBQHと矛盾しない。さらに、進化後集団から当該染色体領域の欠失を持つ株と欠失を持たない株を分離した。現在、同系列から分離した株間の関係を明らかにするため、ゲノム解読と混合実験による解析を進めている。

P1-18

生活環境の改変がメダカの腸内細菌叢に及ぼす影響
— 日和見菌の蔓延は生活環境だけで規定されるのか —○河野 圭丞¹, 佐野 友紀¹, 木原 稔², 菊池 義智³, 伊藤 英臣³¹北海道大・院農, ²東海大・生物, ³産業技術総合研究所

E-mail: kawano.1021@aist.go.jp

多くの動物が腸内に大量かつ複雑な細菌叢を保有しており、その群集構造は気候条件や食餌といった生活環境によって規定されると考えられている。これまでに我々は、野外で採取したメダカ(野生メダカ)と室内で継代飼育されたメダカ(室内飼育メダカ)の腸内細菌叢を比較解析し、エロモナス症や冷水病といった日和見魚病の原因細菌が室内飼育メダカでのみ優占していることを見いだした。この極端な違いもまた生活環境の違いによるものと考えられるが、メダカの遺伝子型の影響も考えられるためその真偽は不明である。そこで野生メダカを室内飼育メダカと同じ条件で飼育し、「高水温で人工飼料を摂餌する室内飼育環境が腸内の日和見魚病菌の優占を招く」という仮説の検証を試みた。

2017年11月に4ヶ所の用水路(水温12.1-13.8℃)で採取した野生メダカ(n=21)を実験室に持ち帰り、室内飼育メダカと同様に脱塩素した水道水と人工飼料を用いて、25℃、長日条件(14時間日照)で30日間飼育した。飼育前後の個体から消化管を摘出してDNAを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。増幅産物は次世代シーケンサーを用いて塩基配列解読し、腸内細菌組成を解析した。

室内飼育前後で野生メダカの腸内細菌叢の群集構造は変化したものの、エロモナス症や冷水病といった日和見魚病を引き起こす*Aeromonas*属や*Flavobacterium*属細菌の優占度は室内飼育後も0.13±0.33%, 0.41±0.62%と低く、これまでに解析した室内飼育メダカの値(25.8±17.1%, 9.6±10.3%, n=36)よりも著しく低かった。このことから本仮説は否定され、高水温で人工飼料を摂餌する室内飼育環境条件下であっても腸内に日和見魚病菌が優占するとは限らないことが明らかとなった。室内飼育しても日和見魚病菌が優占しなかった理由として、生活環境改変前から持っていた腸内細菌の先住効果により、結果として日和見魚病菌の蔓延が抑えられた可能性が考えられた。このように、生活環境の改変のみならず先住する腸内細菌組成もまた、日和見魚病菌の優占度に大きな影響を与える要因であることが示唆された。日和見魚病は幼若魚の肥育養殖現場で頻発する重大な産業問題であり、あらかじめ野生個体の腸内細菌を移植しておくことで、肥育魚の日和見魚病の発症リスクを下げる一助となるかもしれない。

P1-19

Mortierella humilis/verticillata complex とその内生細菌のトマト生育への影響について

○松下 紗季¹, 高島 勇介², 西澤 智康², 太田 寛行², 成澤 才彦²

¹茨城大・院農, ²茨城大・農

E-mail: 18am216n@vc.ibaraki.ac.jp

近年、土壌に普遍的に存在する腐生性菌類である *Mortierella* 属菌に植物生育促進能があることが報告され (Wani *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2019)、筆者らの先行研究でも *M. humilis* S2 がトマト実生の地上部重量を増加させることが明らかとなった。さらにこの *M. humilis* S2 の細胞内に内生細菌 *Burkholderiaceae*-related endobacteria (BRE) が存在することも明らかとなり、抗生物質処理により同 BRE 除去株を作成し、トマト実生への接種試験を行った。その結果、葉の褐変や根部の生育不良が認められた。そこで本研究では、この現象が選抜菌株である S2 に限定されるのか、あるいは、他の *M. humilis* および近縁の菌株でも普遍的に認められるのかを明らかにすること、さらに宿主菌類と BRE の組み合わせによる影響を調査することを目的とした。*M. humilis/verticillata* complex 7 菌株 (BRE 保有 4 菌株、非保有 3 菌株) および *M. chienii* 1 菌株 (BRE 非保有) をトマト実生根部に接種し、23℃ で 2 週間生育後回収し地上部乾燥重量を測定した。その結果、BRE 保有株である YI11、YTM36 および CBS130.66、さらに BRE 非保有株 YTM226 を接種したトマトは地上部重量が増加し、健全に生育した。BRE 非保有株 YTM222 および CBS131.66、さらに BRE 保有株 YTM181 は地上部重量を増加させたが、枯死や根部の生育不良も生じた。また、*M. chienii* を接種したトマトは全て枯死した。以上より、*M. humilis/verticillata* complex の BRE 保有株はトマトの生育を促進する傾向があることが示された。さらに、BRE 非保有株を接種したトマトでは枯死した個体が認められた。本研究においても先行研究と同様に *M. humilis* の植物生育促進に BRE が関与していることが示唆された。また、BRE 保有株 YTM181 はトマト根部の生育不良を起こしたが、同菌株の BRE は供試した他の菌株の BRE とは系統的に異なっており、植物生育促進に関わる BRE に系統間で差があることが示唆された。

P1-20

2 種のシロアリの交雑による腸内共生原生生物の群集構造の経時的変化

○嶋田 拓也¹, 北出 理²

¹茨城大・院理工, ²茨城大・理

E-mail: shimataku44@gmail.com

異なる群集が混合した後、群集構造がどのように変化するかについては不明な点が多い。Gilpin(1994) は、群集モデルを用いたシミュレーションを行い、構成種が密接な相互作用をもつ群集同士を混合すると、混合後の群集は最終的に片方の親群集由来の種組成に収束しやすくなることを示した。この結果は、強い相互作用をもつ群集が“チーム”として振舞うことで、群集レベルの競争に近い現象を引き起こす可能性を示唆する。シロアリの腸内には多数の原生生物や細菌などの微生物群集が存在し、代謝を介し強く相互作用しながら生息している。先に私達は、ヤマトシロアリとカンモンシロアリの 2 種のシロアリを交雑させ、各シロアリ種に特異的な原生生物群集を混合する実験を行った。この実験では交雑コロニーの大部分がヤマト型の種組成に収束した。ただし、この実験では群集を構成する各原生生物種の個体数が時間経過に伴ってどのように変化していくかは調査されていない。

本研究では、ヤマトシロアリとカンモンシロアリの 2 種の生殖虫に交雑コロニーを創設させて、共生原生生物群集を混合させ、生殖虫(親)とワーカー(子)が保有する各原生生物種の個体数の時間経過に伴う変化を調査した。ヤマトシロアリは宮崎県日南市、カンモンシロアリは山口県下関市で採取した。個体数の調査は、光学顕微鏡で各原生生物種の形態を観察して同定・計数を行った。コロニー創設から 120 日後に交雑コロニーでは大部分のコロニーでカンモンシロアリに特異的な原生生物種の消失が見られ、ヤマト型の種組成に収束した。混合型の種組成が群集として安定しておらず、その結果として群集同士での競争が起り、より群集として安定なヤマト型の種組成に収束したと考えられる。さらに、120 日後以降は種組成としてヤマト型に収束した後でも、ヤマトシロアリに特異的な原生生物種の割合が徐々に減少していく傾向が見られた。種組成が収束した後でも、各原生生物種の個体数比の変化という形で群集構造の変化が継続することが新たに確認された。これは混合時に各原生生物種の個体数比のバランスが大きく崩れ、その後構成種の長期共存が可能な最も安定した個体数比に収束するまでに長い時間がかかるためと考えられる。

P1-21

従属栄養細菌との相互作用を介した硝化菌の増殖促進機構

○井出 寛人¹, 石井 拳人¹, 藤谷 拓嗣², 常田 聡¹

¹早大院・生医, ²産総研・バイオメディカル研究部門

E-mail: hrt-sunrocker@moegi.waseda.jp

硝化菌は土壌や水圏に幅広く分布しているにも関わらず、平板培養や限界希釈に代表される古典的な手法では分離培養が難しい。実験室環境で硝化菌を扱うことが困難である原因の1つに、分離培養すると従属栄養細菌との共存関係が断ち切られてしまうことが挙げられる。本研究では従属栄養細菌との相互作用が硝化菌の増殖を促進させる鍵であると予想し、そのメカニズム解明を目指す。相互作用を及ぼしあっているモデル微生物として、当研究室で単離した硝化菌 *Nitrotoga* sp. AM1 と従属栄養細菌 *Acidovorax* sp. NB1 に着目した。*Nitrotoga* は亜硝酸を硝酸へ酸化することでエネルギーを獲得する化学合成独立栄養細菌である。*Nitrotoga* 集積株において、*Nitrotoga* は特定の従属栄養細菌 *Acidovorax* と共凝集体を形成していた。これは局所的な環境で *Acidovorax* と *Nitrotoga* が相互作用を及ぼしあっている可能性を示唆している。そこで単離株 AM1 の異なる増殖フェーズ-対数増殖期および誘導期-に単離株 NB1 がもたらす影響を調べた。亜硝酸を含む無機培地で AM1 細胞のみを懸濁した単独培養系と、AM1 および NB1 細胞を懸濁した共培養系を用意した。2つの培養系でそれぞれ AM1 細胞数を測定したところ、NB1 と共存すると AM1 の増殖速度と増殖収率が上昇することがわかった。培地から活性酸素種を除去すると硝化菌の増殖活性が高くなることが知られており、同様に NB1 が酸化ストレスを低減させたことで AM1 の増殖速度が早くなった可能性がある。共培養系で増殖収率が高くなった理由として、NB1 が硝酸から AM1 の基質である亜硝酸を生成し、AM1 に再供給したことが予想される。実際、NB1 は硝酸を亜硝酸へ還元する酵素 (NAR) をコードする遺伝子を保持している。誘導期において NB1 が及ぼす影響を確かめるため、 10^2 - 10^4 cells/mL となるように AM1 細胞の初期菌体数を調整した単独・共培養系を用意した。興味深いことに、菌体密度が低いと AM1 単独では増殖が休止化した一方、NB1 存在下では AM1 の再増殖が確認された。初期菌体密度が低くても NB1 が分泌する“生育因子”を受け取って AM1 の増殖が覚醒したと考えられる。今後は単独培養系と共培養系を対象としてプロテオーム解析を実施し、共培養系で見られた増殖促進効果の根底にある分子レベルでの相互作用メカニズムを明らかにしていく。

P1-22

30年無施肥水田内における *Burkholderia kururiensis* の機能性、挙動ならびに垂直伝播経路の解明

○正田 雄紀¹, 立花 誠治¹, 前川 雅彦², 橋床 泰之¹

¹北海道大・院農, ²岡山大学資源植物科学研究所

E-mail: ykmii828@eis.hokudai.ac.jp

【背景】ハイブリットイネ pLIA-1 (*Oryza longistaminata* × *O. sativa* ssp. *japonica* T-65) は、岡山大学資源植物科学研究所で30年以上完全無施肥管理下に置かれている実験水田での高い収穫性を指標に選抜された交雑後代系統イネである。このイネは無施肥条件下で収量が高くなる傾向があり、これは無施肥水田で栽培した pLIA-1 根圏あるいは根内に共生性の高い窒素固定細菌である *Burkholderia kururiensis* が優占することによって考えられている。しかし、水田土壌からも収穫した籾内からもその痕跡さえも検出されないことから、土壌・種子伝播性いづれでもないと分かり、この細菌がどこから伝播するかは分かっていない。そこで、この細菌の機能性とその振る舞いから、水田内でのイネから次年度のイネへの垂直伝播経路の探索を試みた。

【方法と結果・考察】2017年・2019年の籾を収穫し、稲わらを全て持ち出した冬季水田土壌から pLIA-1 の当年死根および越年死根残渣を回収し、PBS buffer 中でそれを破砕し、細菌 DNA を回収した。それをテンプレートとして得られる 16S rRNA 領域を標的として、次世代シーケンサー (NGS) による菌叢解析を行い、同時に *B. kururiensis* の分離を試みた。分離には貧栄養 MWG (Winogradsky's 無機塩-ショ糖-ジェランガム) 平板を用い、死根残渣を PBS buffer に懸濁し、大過剰に希釈して平板に広げ、出現した *B. kururiensis* 様のコロニーの 16S rRNA 遺伝子領域を増幅して、分離した細菌種の同定を試みた。また、その過程で分離・同定した *B. kururiensis* 以外の細菌種についても、それぞれニトロゲナーゼ遺伝子 *nifH* の塩基配列を調べ、*B. kururiensis* や他の普遍的な窒素固定細菌がもつ *nifH* との相同性を比較した。死根残渣から回収した細菌 DNA の NGS 解析の結果からは *Burkholderia* 属細菌および *B. kururiensis* の優占が認められたが、MWG 平板を用いたスクリーニングでは *B. kururiensis* をイネ死根残渣から直接分離することはできなかった。一方、過去の実験で見出した、pLIA-1 芽生え根の MeOH 抽出物が幾つかの遅育性根面細菌の生育を促進する現象から、死根残渣内で休眠状態にある *B. kururiensis* はイネ生根と接触して初めてその休眠が打破されるとの仮説を立てた。ジェランガムベッドで1週間育成した無菌 pLIA-1 イネ苗根圏に洗浄後死根残渣を接種し、生きたイネ根周辺で増殖した細菌群集から *B. kururiensis* や他の窒素固定細菌の探索を開始している。

P1-23

群体ボヤの被囊に生息するバクテリア相の解析

○山崎 玲^{1,2}, 新里 尚也^{1,2}, 伊藤 通浩¹, 広瀬 裕一²

¹琉球大・熱生研, ²琉球大・理

E-mail: k198397@eve.u-ryukyu.ac.jp

【背景と目的】海産無脊椎動物であるホヤ類には、岩などに固着して単独で生息する単体ボヤと、小さな個虫が出芽によって群体を形成する群体ボヤとがある。ホヤ類の体は被囊と呼ばれるセルロース性の外被組織で覆われており、そこにはバクテリアを中心とする特徴的な微生物相が形成されている。また、一部の群体ボヤの被囊内には、ネジのような独特の形状を持ったバクテリアが存在することも報告されているが (Hirose & Saito, 1992)、それらの系統学的帰属や、宿主であるホヤとの関係性については明らかにされていない。そこで本研究では、沖縄近海に生息する同属の群体ボヤ 2 種について、被囊に生息するバクテリア相を解析することにより、ホヤの被囊内微生物に関する更なる知見を得ることを目的とした。【材料と方法】2018 年 10 月に沖縄県北谷町砂辺海岸において、2 種の群体ボヤ *Clavelina cyclus* と *C. obesa*、ならびに周囲の海水を採取して実験に用いた。ホヤの被囊部分と海水の濾過サンプルから DNA を抽出し、バクテリア 16S rRNA 遺伝子を Illumina MiSeq によって解析した。また、*C. cyclus* の被囊部分と *C. obesa* の個虫のパラフィン切片を作成し、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) により被囊内のバクテリアを特異的な蛍光プローブによって検出することを試みた。【結果と考察】微生物相解析の結果、ホヤと海水のバクテリア組成は大きく異なっており、ホヤの被囊に独特なバクテリア相が形成されている様子が伺えた。また、同じ *Clavelina* 属においても被囊のバクテリア相は大きく異なっていることが示された。具体的には、*C. cyclus* においては Bacteroidetes 門に属するバクテリアの出現頻度が高く、*Reichenbachiella* 属、*Aestuariaispira* 属、*Lutibacter* 属のそれぞれ 10TU で 51.8% を占めた。一方で *C. obesa* においては、Proteobacteria 門の出現頻度が高く、*Amylibacter* 属、*Maritimibacter* 属、*Thiogranum* 属のそれぞれ 10TU で 49.5% の出現頻度を占めた。DAPI 染色ならびにバクテリアのユニバーサル・プローブを用いた FISH による被囊の蛍光顕微鏡観察の結果から、両種のホヤの被囊には多様なバクテリアが生息しており、特に *C. cyclus* の被囊内には、糸状やネジ状といった独特の形態をもつバクテリアが多数存在することが示された。現在、バクテリアの微生物相解析において高い頻度で検出されたバクテリア系統について FISH による特異的検出を試みている。

P1-24

微細藻類 *Scenedesmus* sp. YK 共生細菌群を介する Methanol 添加による藻体増殖促進の調査

○菅家 雅史, 佐藤 敏幸, 日秋 俊彦, 矢木 修身

日大院・生産工

[背景] 微細藻類は、バイオディーゼル燃料 (BDF) やサプリメント、飼料等様々な分野で注目されているものの、依然としてバイオマス生産性の低さに課題があり、生産性向上を目的として微細藻類の増殖を促進させる培養手法が求められている。既往の研究では、細菌等のコンタミネーションによる藻体バイオマス生産性低下を防ぐため、単一藻類の純培養の維持が重要視されてきた。一方、自然界で存在する藻類を中心とする細菌群との共生環境における相利共生を利用した藻体増殖促進が近年注目されている。また、有機物添加による藻類増殖促進法も報告されているが、増殖促進のメカニズムには未解明な点が多い。そこで、本研究では、藻類と共生細菌との共生環境に及ぼす有機物添加の影響に着目した。複数の有機物添加による増殖促進が確認されている研究室保有藻類株 *Scenedesmus* sp. YK を用い、添加有機物の中でも比較的低コストである Methanol 添加における藻類と共生細菌への影響を調査した。

[実験方法] 500 mL 三角フラスコに Chu-No.10 改変培地を 300 mL 加え、オートクレーブ滅菌後、藻体前培養液 3 mL を接種した。培養環境は温度日中 25 ± 0.5 °C、夜間 20 ± 0.5 °C 植物培養用蛍光灯を用いた 12 時間周期の明暗光照射条件下であり、12 日間程度静置培養とした。研究室保有藻類株 *Scenedesmus* sp. YK は山形県霞城公園にて採取したものを継代培養したものであり、単一藻類の純培養 (Axenic 培養)、共生細菌群を維持した培養 (Xenic 培養) を実験に使用した。はじめに、2 つの培養系に対し、Methanol を濃度 0, 1, 10, 50, 100 g/L となるように添加し増殖を評価した。次に、共生細菌群をコロニーの形態で 9 つに単離し、それぞれに Methanol 濃度 1.0 g/L 下にて藻類と共培養させた。藻体増殖の評価は、吸光度測定 (波長 660 nm)、検鏡にて行った。

[結果] Axenic 培養では、どの濃度の Methanol も藻体増殖促進効果を示さなかった。一方、Xenic 培養では、Methanol 濃度 1, 10 g/L 下において藻体増殖が大幅に促進された。どちらの培養においても Methanol 濃度 50, 100 g/L 下では増殖は阻害された。単離した共生細菌と藻類の共培養では、9 つのコロニーのうち、5 種において藻体増殖が促進された。

P1-25

水生植物ウキクサと親和性・定着性の高い細菌の検索

○武川 悦子¹, 田中 靖浩¹, 鈴木 山太¹, 岩下 智貴¹, 遠山 忠¹, 玉木 秀幸², 牧野 彩花², 鎌形 洋一², 森川 正章³, 森 一博¹

¹山梨大院・医工農, ²産総研・生物プロセス, ³北大院・環境

E-mail: g18lr009@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】

ウキクサを用いて廃水を処理しつつ、得られた植物体をバイオマス資源として利用する浄化システムの開発において、本研究グループでは、バイオマス生産能向上のために植物生育促進細菌 (Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB) をウキクサに導入する方法を検討してきた。しかし、土着微生物が存在する実廃水中では導入菌が定着せず、活性が発揮されないケースが見受けられた。そこで、ウキクサと親和性・定着性の高い細菌を検索し、その中から PGPB を見出すこととした。

【方法】

ウキクサと親和性の高い微生物を検索するために、無菌化した当該植物に 5 種類の環境微生物群集 (河川水、活性汚泥、土壌、Anammox 集積汚泥、雨水) をそれぞれ接種し、10 日間共培養した後の根と葉状体に形成する微生物群集を対象に 16S rRNA アンプリコン解析 (次世代シーケンス法) を行った。

PGP 活性の評価は、試験対象とする菌株を接種したウキクサを食品工場廃水中に投入したときの生育促進効果を、無菌ウキクサを投入した対照試験区と比較することで行った。

【結果と考察】

16S rRNA アンプリコン解析の結果、*Sphingomonadaceae* 科 (1.2 ~ 11.1 %)、*Comamonadaceae* 科 (8.1 ~ 30.0 %)、*Methylophilaceae* 科 (12.1 ~ 39.4 %) が全てのウキクサ根および葉状体試料で 1% 以上の分布率を示した。特にこれらの中で、*Methylophilaceae* 科については、ウキクサに接種した環境微生物群集と比較して顕著な分布率の向上が見られた (最大 3145 倍; *Sphingomonadaceae* 科細菌は最大 20 倍、*Comamonadaceae* 科細菌は最大 48 倍)。以上より、本研究ではこの細菌群をウキクサと親和性・定着性の高い細菌であると判断した。

Methylophilaceae 科細菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法によるスクリーニングでは、ウキクサ由来の 308 株中 29 株が陽性となり、それらの 16S rRNA 遺伝子を解析したところ 15 株が目的の細菌群に属していることが分かった。この中で生育が良好であった 11 株を対象にウキクサの生育促進能を評価したところ、2 株に高い PGP 活性が見出された (葉状体数、乾重量の両方において 1.8 ~ 2.7 倍)。

P1-26

クララ (マメ科) の根粒内バクテリア構成の解析

○星山 美樹¹, 横山 潤²

¹山形大・院理, ²山形大・理

マメ科植物は、一般に根粒内で窒素固定を行うバクテリア (根粒菌) と共生関係を結んでいる。多くの根粒菌の系統は、特定のマメ科植物種と共生関係を結ぶ性質を持っている。これに対して *Sophora* 属は多様な根粒菌と関係を結ぶことが知られており、植物への異なる根粒菌の効果を明らかにする優れた系になりうる。クララ (*Sophora flavescens*) は草地に生育する多年草で、被食防御機構としてアルカロイドを含有している。アルカロイドは根で合成されるので、宿主が根の成長を促進または高い窒素固定能を付与するバクテリアと共生関係を結ぶと、アルカロイド合成量が変化してクララの地上部での相互作用が変わるかもしれない。本研究ではこれらの相互作用を解析するために、まず日本のクララ集団について根粒内バクテリア構成を調べた。

東日本の 5 地点 (青森県平川市、山形県大石田町、同南陽市、福島県喜多方市、茨城県石岡市) でクララをサンプリングし、これらから根粒を採取して、表面殺菌後にバクテリアを単離した。得られたバクテリアの 16SrRNA 遺伝子の部分配列を決定し、分子同定を行った。さらに 4 地点のサンプルについては、根粒内バクテリアのメタゲノム解析を行った。

単離したバクテリアの分子同定の結果、根粒菌 5 属 (*Mesorhizobium* 属、*Rhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Methylobacterium* 属、*Burkholderia* 属) とその他のバクテリア 7 属 (*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属、*Dyella* 属、*Paenibacillus* 属、*Cohnella* 属、*Lysinibacillus* 属、*Mycobacterium* 属) が同定された。根粒菌 5 属が同定されたことは、クララが多様な根粒菌と共生関係を持つという中国の先行研究の結果を支持した。本研究では全 5 地点で *Mesorhizobium* 属が最も高頻度に単離され、メタゲノム解析の結果も同様だった。先行研究でも高頻度で単離されていることから、*Mesorhizobium* 属はクララにとって最も関係を結びやすいのかもしれない。根粒菌以外のバクテリア 7 属はいずれもマメ科植物の根粒から記録されている。*Cohnella* 属を除く 6 属は、菌株によっては植物の成長を促進する可能性がある。これらのバクテリアもクララの成長に影響しているかもしれない。

P1-27

資源競合条件下における異属三菌株共存を可能とする菌株間相互作用の 数理的解析

○天野 光喜¹, 鈴木 研志², 本荘 雅宏², Azwani Fatma³, 齋藤 保久⁴, 木村 元彦¹, 田代 陽介¹, 二又 裕之⁵

¹静大・工, ²静大院・自然科学系教育部, ³Institut Trop. Agr. Univ. Putra Malaysia, ⁴島根大・総合理工, ⁵静大・グリーン研

単一基質を供給する連続集積培養系において、基質利用特性の異なる微生物種が共存することは原理的に不可能である。その理由は、僅かでも基質利用力が高ければ他の菌株の生育は抑制され、結果的に淘汰される為である。この理論は競合排除理論 (competitive exclusion theory) として知られている。しかし、実験室内で構築した合成微生物系においてでさえも、この理論に従わないことが多くの研究成果によって示されている。当研究室に於いても、フェノールを唯一の炭素源とする連続集積培養系において、フェノール利用特性が異なる異属三菌株が共存することが示されている。その要因として、代謝ネットワークによる微生物間での役割分担や、リアクター内の基質濃度の不均一性が指摘されている。一方、増殖に及ぼす微生物間相互作用は、菌株間の関係を把握することが出来るものの、その関係性が微生物群集の共存にどの様に影響しているのかを総合的に判断することは未だできていない。そこで本研究では、実測された増殖に及ぼす微生物間相互作用力、増殖パラメーターおよび基質に対する速度論量を基に、数理的に解明することを目的とした。

供試菌株は *Pseudomonas* sp. LAB-08 株、*Comamonas testosteroni* R2 株および *Cupriavidus* sp. P-10 株である。フェノールに対する親和性と増殖速度定数から導出される J 値および増殖に及ぼす微生物間相互作用力は LAB-08 株 > P-10 株 > R2 株の順に高い。その為、 J 値からは R2 株の、相互作用からは LAB-08 株の優占化が推定されたが、実際の合成微生物生態系では三菌株は共存した。そこで増殖に及ぼす微生物間相互作用力は菌密度に依存すると考えられる為、Lotka-Volterra モデル式に微生物間相互作用力を変数として導入したモデルを構築した。微生物が共存するということは J 値が等しいことと同義である点に着目し上記モデル式を解析した。その結果、純粋培養条件下で得られた J 値が菌株間相互作用によって変動し得ること、また、共存するために必要な相互作用の関係性を合成微生物生態系全体の中で捉えることを可能とした。以上の結果は、特性の異なる微生物を利用した生態系のデザインにとって有効なツールとなるものと期待される。

P1-28

時系列データから読み解く細菌群集の種間相互作用強度ネットワークと非線形動態

○藤田 博昭¹, 阿部 真人², 山道 真人³, 木庭 啓介¹, 潮 雅之^{1,4,5}, 東樹 宏和^{1,4}

¹京大・生態研, ²理研・AIP, ³東大・総合文化, ⁴JST さきがけ, ⁵京大・白眉

E-mail: fujita.h@ecology.kyoto-u.ac.jp

生物群集の安定性や動態は、種数や種間結合度といった群集レベルで定義される指標と関連があると理論的に予測されている。しかし、複雑な生物群集、特に多種微生物系において、群集動態を決定する要因を厳密に探索する実証研究は、未だに存在しない。本研究では、森林土壌と淡水由来の細菌群集を3種類の培地に投入し、合計で96の細菌群集を培養した。その96群集それぞれを110日間に亘って、1日1回の連続サンプリングを行なった。DNA濃度が既知の標準DNAを用いて、16S-rRNA アンプリコン解析を行い、定量的に細菌群集を明らかにした。得られた時系列データは非線形性を示していたため、Empirical Dynamics Modeling (EDM) を適用して種間相互作用強度を算出した。その結果、細菌群集の構造は常に変動し続ける一方、大局的にみるといくつかの群集組成クラスターに分類できることがわかった。また、外的な攪乱を与えない場合でも、この群集組成クラスター間の移動が起こることが確認できた。種間相互作用強度も日毎に変動を示したが、多くの種間で、その強さと正負は一定していた。変動し続ける動態の定常状態を定義づけすることにより、変動の大きさと変動のしやすさを定量化し、種間相互作用強度と変動性の関係について解析を行っている。

P1-29

Roseomonas 属細菌由来 Penicillin G アシラーゼの *N*-acylhomoserine lactone 分解活性の評価

○関 篤也, 奈須野 恵理, 加藤 紀弘

宇大・院地域創生

E-mail: mc196621@cc.utsunomiya-u.ac.jp

Roseomonas sp. TAS13は、グラム陰性細菌のQuorum Sensing (QS) 機構の主なシグナル物質である*N*-acylhomoserine lactone (AHL) を加水分解する細菌として当研究室で活性汚泥から単離された。TAS13株のゲノムから同定されたPenicillin G acylase (PGA) は、既知のAHL acylaseとアミノ酸配列相同性が高いことからAirPと命名し遺伝子をクローニングした結果、AHLに対する分解活性を示した。AHLを分解するPGAやPenicillin Gを分解するAHL acylaseは数例報告されているが基質選択性の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、*Roseomonas*属細菌に由来するPGAのAHL分解活性から基質選択性を解析し、自然環境に広く分布している*Roseomonas*属細菌がAHLの分解という形で細菌コミュニティにおいて普遍的にQS機構に関与している可能性を明らかにすることを目的とした。*Roseomonas aerilata*と*Roseomonas stagni*が保有するPGAをそれぞれRaPGA、RsPGAと命名し、遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子組換え体から抽出したプラスミドDNAを鋳型として、制限酵素認識サイトを5'末端にそれぞれ付加したPGA増幅用プライマーを用いてPCRを実施した。制限酵素処理したPCR産物をMBP融合タンパク質発現用ベクターにライゲーションし大腸菌へ形質転換後、大量培養した遺伝子組換え体からPGAを抽出、精製した。Penicillin Gまたはアシル鎖長がC6～C12のAHLに各PGAを0.25 mg添加し反応後(30° C, 3 h)、70° C, 10 minで酵素を失活させた。Penicillin G分解サンプルは高速液体クロマトグラフィーの逆相ODSカラムに20 mMリン酸バッファー (pH = 6) : アセトニトリル = 4 : 1の移動相を通液し225 nmの吸光度を検出した。AHL分解サンプルはAHLレポーター株*Chromobacterium violaceum* CV026, VIR07のQS応答性紫色色素生産量を指標に分解率を算出した。各PGAの分解率を見積もった結果、RsPGAとRaPGAでそれぞれ11%, 23%であった。*R. aerilata*と*R. stagni*はどちらもPenicillin G (0.1 mg/mL) への耐性がなく、Penicillin G添加培地で増殖可能な*Roseomonas* sp. TAS13と比べてPenicillin分解活性が低い結果と一致する。一方、AHLに対する分解活性はRaPGAよりもRsPGAの方が高かった。*Roseomonas* sp. TAS13由来のAirPと比較するとAHL分解活性は劣るものの、*Roseomonas*属細菌の有するPGAが共通してPenicillinだけでなくAHLを基質として加水分解可能であることが示唆された。

P1-30

可動性因子を用いた緑膿菌の細胞間コミュニケーションの切替

○須澤 由希¹, 遠矢 正城¹, 尾花 望^{3,5}, 吉澤 晋⁴, 木暮 一啓⁴, 野村 暢彦^{2,5}, 豊福 雅典^{2,5}

¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・医・TMRC, ⁴東大・大気海洋研, ⁵筑波大・MiCS

E-mail: s1821110@s.tsukuba.ac.jp

【目的】Quorum sensing (QS) は微生物間コミュニケーション機構の一つであり、シグナル物質を介して周囲の菌体密度を感じし様々な遺伝子の転写を調節する。一方で、本機構が環境中でどのように進化しているかについての知見はほとんどない。我々は水環境から単離された緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のQSシステムを解析したところ、これらの環境単離株の中には臨床単離株PAO1と比べてシグナル生産量や応答性が異なる株が複数存在し、特に貧栄養環境である外洋域からはQSの機能が一部欠損した株が単離された。このことから、緑膿菌のQSシステムが環境に応じて変遷していることが考えられる。興味深いことにQS欠損株の中にはQS関連遺伝子(*lasR*)に挿入配列(IS)を持つ株が存在し、その株では集団から二種類のコロニー形態が出現した。本研究では、環境に応じたQSシステムの変遷を理解するために、ISとQSの関係を解析することにした。

【結果】コロニー形態が異なる二種類の株をそれぞれ単離し、シーケンス解析を行ったところ、両者ともにゲノム中の*lasR*以外のlocusに共通のISを複数有することが明らかとなった。ISが挿入されていない*lasR*を持つ細胞を単離し、継代培養すると*lasR*にISが挿入された細胞が出現した。また、この株を継代培養するとISが*lasR*から転出し、完全な*lasR*に戻ることが確認された。このことから、ISは可動性を失っておらず、*lasR*へのISの挿入・転出がQS活性を変化させることが明らかとなった。興味深いことに、本ISはメンブレンベシクル(MV)にも含まれており、細胞間で伝播する可能性が示唆された。

【考察】QSシステムは一般的にエネルギーコストが高いと考えられていることから、ISの挿入・転出によるQSのON-OFFの切り替えは、環境に応じた生存戦略であると予想される。当該ISの挿入・転出メカニズムを理解することは、QSシステムが環境に応じてどのように変遷するのか理解する糸口になると考えられる。

P1-31

発電菌 *Geobacter sulfurreducens* 三株間の比較ゲノム解析及び高発電株におけるトランスクリプトーム解析

○藤川 昂¹, 小椋 義俊², 河野 好裕¹, 林 哲也², 井上 謙吾¹

¹宮崎大学・農, ²九州大学・医

E-mail: ac16023@student.miyazaki-u.ac.jp

【背景・目的】 偏性嫌気性細菌である *Geobacter sulfurreducens* は、純粋培養系の微生物燃料電池で高い発電能力を示すことが知られている。また、全ゲノムが明らかになっており、遺伝子改変技術も確立されていることから、細胞外電子伝達メカニズム研究のモデル生物として研究が進められている。しかし、未だ細胞外電子伝達メカニズムの全容の解明には至っていない。*G. sulfurreducens* は、これまでに標準株である PCA 株の他に、PCA 株より高い電流生成量を示す KN400 株も単離され、全ゲノムが決定されている。さらに、本研究グループでは宮崎県八重川の土壌から KN400 株と同等の高い電流生成量を示す YM18 株を単離し、全ゲノムも決定された。そこで、PCA、KN400、YM18 株の 3 株間での比較ゲノム解析を行い、さらに、YM18 株において電流生成時と電流非生成時におけるトランスクリプトーム解析により、高い発電能力に重要な遺伝子の絞り込みを行う。

【結果】 比較ゲノム解析の結果、YM18 株中の遺伝子の 91% が PCA 株と KN400 株にも共通して存在していた。また、高発電株である KN400 株と YM18 株にのみ共通する遺伝子は 40 個、YM18 株にのみ保存されている遺伝子は 213 個であった。電子の授受に重要な役割を果たす分子である *c* 型シトクロムをコードしている遺伝子の数は、PCA、KN400、YM18 株それぞれで、107 個、104 個、100 個と大きな違いは見られず、TCA サイクルなど中心代謝系に関連する遺伝子も高度に保存されていた。トランスクリプトーム解析の結果、電流非生成時に比べて電流生成時に有意な発現変動が見られた 168 個の遺伝子のうち 44 個が機能未知の遺伝子であった。発現が上昇していた遺伝子は 97 個であり、3 個の酢酸トランスポーターと 5 個の *c* 型シトクロム遺伝子が含まれていた。一方、発現が低下していた 71 個の遺伝子の中には、6 個の重金属トランスポーターと 3 個の *c* 型シトクロム遺伝子が含まれていた。発現変動が見られた *c* 型シトクロムの中には、過去に PCA 株で電流生成に関与していることが報告されている遺伝子は存在しなかった。また、比較ゲノム解析で特定された高発電株にのみ共通する遺伝子の中では、唯一ジスルフィド結合触媒酵素クラスターのみが発現変動（低下）していた。

P1-32

低有機物負荷 A/O-MBR における膜ファウリング緩和に関する微生物の推定

○滝本 祐也, 鞍立 大喜, 三輪 徹, 幡本 将史, 山口 隆司

長岡技科大・院工

E-mail: s165001@stn.nagaokaut.ac.jp

膜分離活性汚泥法 (Membrane bioreactor: MBR) は、高い排水処理水質を得られる一方で、運転中の膜面付着層の形成に伴う膜面透過流速の低下 (ファウリング) が主要な問題である。微生物解析手法の発展に伴い、膜ファウリングを発生させる能力が高い細菌や膜面バイオフィーム形成を担うが推定されている。しかしながら、MBR 活性汚泥の複雑な微生物群集構造の違いが膜ファウリングに与える影響は明らかになっておらず、安定的な MBR の運転に最適な微生物叢を把握することが重要であると考えられる。これまでの研究で、低有機物負荷で A/O-MBR を運転することによってバイオフィーム形成を伴う膜ファウリングを誘発することを見出した。低温低有機物負荷条件では、膜ファウリング発生の再現性が実証されているが、高温低有機物負荷運転では膜ファウリングの発生が遅延する場合が確認された。そこで、我々は活性汚泥の 16S rRNA 遺伝子に基づく解析を行うことで微生物群集構造の違いが膜ファウリングに与える影響を調査するとともにファウリングの緩和を担う細菌の推定を行った。実験では、低温低負荷条件 (RL)、高温低負荷条件 1 (RH1: ファウリング発生無)、高温低負荷条件 2 (RH2: ファウリング発生有) の A/O-MBR をそれぞれ運転し、各種水質項目と活性汚泥中の微生物群集構造解析を実施した。ファウリングが発生した RL および RH2 では、活性汚泥中に溶解性有機物 (TOC) が蓄積していた。一方で、ファウリングが発生しなかった RH1 では、活性汚泥中に溶解性 TOC の蓄積があまり観察されず、溶存有機物が問題なく分解されている可能性が示唆された。このとき RH1 では運転中期において Chloroflexi 門に属する *Candidatus Promineofilum* 属の検出割合が特異的に増加していた。Ca. *Promineofilum* 属細菌は、多糖やタンパク質などの高分子物質を分解する機能が報告されており、ファウリングの原因となる物質を分解したことで安定的に運転を継続することができたと考えられる。また、各リアクターの活性汚泥の微生物多様性指数を比較したところ、RL では多様性は変化せず、RH1 および RH2 では変化が見られた。特に RH2 では大きく多様性が減少していることが明らかとなり、活性汚泥中の微生物多様性が MBR のファウリング発生に寄与したことが示唆された。

P1-33

ヒト毛髪に付着する細菌群集安定性と起源

○渡邊 康太¹, 西 英二², 田代 幸寛¹, 酒井 謙二¹

¹九大院・生資環, ²大分科捜研

E-mail: kobutin52@gmail.com

【背景】

人体には多くの細菌が存在し、部位により独自で多様な細菌群集構造を形成している。我々はこれまでに、一定量の細菌がヒト毛髪に存在し、その群集構造の違いから Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法により異動識別が可能であることを示した (Nishi, et al., Legal Medicine, 2017)。ヒトの異同識別は 6 ヶ月後でも可能であったが、その起源や詳細な群集構造の安定性については不明であった。今回我々は、毛髪を毛根部と毛幹部を 3 部位に分け、より詳細に qPCR 法による細菌数の計測、NGS を用いた OTU レベルでの群集構造解析を行った。

【方法】

被験者 6 名 (男性 4 名、女性 2 名) から毛髪の提供を受け、毛根および毛幹 (基底部・中間部・先端部) の 4 つの断片に切断しサンプルを調製した。また、洗髪による影響を調べるため、3 段階の濃度に希釈した TritonX-100 水溶液を用い、毛髪洗浄サンプルを調製した。調製後、各毛髪サンプルを低真空・無蒸着下で電子顕微鏡を用いて表面 1 cm² 当たり付着する細菌の存在量の定量および形態を観察した。また、qPCR 法にて毛髪 1 cm² 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。さらに、NGS による 16S アンプリコン解析を行なった。

【結果】

qPCR 法によるコピー数計測の結果、毛幹部ではいずれの部位でも平均 10⁵~10⁶ copies/cm²、毛根部では平均 10⁷ copies/cm² の細菌を計測した。これらの結果は SEM 観察による細菌数計測の結果と相関があった。また、毛髪洗浄サンプルは全ての被験者でコピー数に有意差がなかった。細菌群集構造解析の結果、主要細菌門は全ての毛髪サンプルで Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes 門であった。 α 多様性解析の結果、毛幹では毛根よりも有意に多様度が大きいことを確認した。OTU レベルでの解析の結果、主要細菌種はいずれの被験者、更に毛根部と毛幹部で共通していることが明らかとなった。また、個々の被験者で主要細菌の占有率は有意に異なっていたが、同一被験者内では毛根と毛幹に付着する主要細菌の占有率が類似していた。以上の結果から、ヒト毛髪の毛根および毛幹には共通した細菌種が定着しており、毛幹定着細菌は毛根に由来する可能性が示唆された。主要細菌種の占有率が個々人で異なる要因については、現在、例数を増やし解析中である。

P1-34

Diel changes in energy metabolism of the thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans* in cyanobacteria-dominated microbial mats revealed by metatranscriptomic analyses

○Shigeru Kawai¹, Joval Martínez^{1,2}, Mads Lichtenberg³, Erik Trampe³, Marcus Tank¹, Michael Kuehl³, Shin Haruta¹, Satoshi Hanada¹, Vera Thiel¹

¹Dept. of Biol. Sci., Tokyo Metropolitan Univ., ²Dept. of Nat. Sci., Univ. of St. La Salle, ³Dept. of Biol., Univ. of Copenhagen

E-mail: sk.harmonics.1210@gmail.com

Anoxygenic phototrophic *Chloroflexus aggregans* are versatile, thermophilic *Chloroflexi*, which can grow photoheterotrophically, photoautotrophically, chemoheterotrophically, and chemolithoautotrophically. In hot spring associated microbial mats, *C. aggregans* co-exists with oxygenic phototrophic cyanobacteria. In these mats, the micro-environmental conditions undergo diel changes e.g., in oxygen concentration, light, and pH. To elucidate the predominantly energy metabolism of *C. aggregans* in those natural environments, relative transcription levels of energy-metabolism-related genes were examined in cyanobacteria-dominated microbial mats from Nakabusa hot springs (Japan) at 56 °C over a diel cycle. Relative transcription levels were compared with environmental conditions, such as oxygen, sulfide and light data measured with microsensors within the mats. Metatranscriptomic analyses revealed phototrophic metabolism, with photoautotrophic and photoheterotrophic phases. Consistent with the prediction that *Chloroflexus* perform light-driven CO₂ fixation during low-light periods, genes encoding sulfide-quinone oxidoreductase and uptake hydrogenases, as well as genes encoding for key enzymes for carbon fixation, were highly transcribed in late afternoon, when the mats became anoxic but indirect sunlight was still available. These results suggest that *C. aggregans* in the cyanobacteria-dominated mats fixes CO₂ photosynthetically using sulfide and hydrogen as electron donors under anaerobic light conditions in the late afternoon. During the midday with direct sunlight, when the mats are supersaturated with oxygen, *C. aggregans* is indicated to perform aerobic respiration. In contrast, in the early morning before sunrise, the peaks of genes encoding uptake hydrogenases, key enzymes for carbon fixation, and superoxide dismutase were detected in the dark, suggesting the chemolithoautotrophic lifestyle of *C. aggregans* and/or preparations for the autotrophy with hydrogen.

P1-35

人工の代謝酵素遺伝子クラスターを利用した高機能有機塩素殺虫剤資化細菌の育種

○蘇 立俊, 加藤 広海, 大坪 嘉行, 津田 雅孝, 永田 裕二

東北大・院生命科学

E-mail: soritsushun@ige.tohoku.ac.jp

【背景と目的】有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) は人為起源の難分解性物質であり、その汚染に対する国際的な取り組みが求められている。一方で、 γ -HCHを分解資化する細菌株が世界各地の汚染土壌から単離されている。これら株はいずれも *Sphingobium japonicum* UT26 株で同定された γ -HCH 分解代謝酵素遺伝子群 (*lin* 遺伝子群) とほぼ同一の遺伝子群を有しており、UT26 株と同様の代謝経路で γ -HCH を分解資化すると考えられている。しかし、これら天然の γ -HCH 分解細菌株は、(i) *lin* 遺伝子群がゲノム中に散在し、近傍に存在する挿入配列 IS6100 の影響で遺伝的に不安定であり、 γ -HCH 分解資化能が安定維持されない、(ii) γ -HCH 代謝過程において有毒な dead-end 産物を生じるという特徴を有している。これら特徴は、天然の γ -HCH 分解細菌株の適応の不十分さを強く示唆すると共に、環境浄化への応用の際に問題となる。そこで、本研究では、人工の γ -HCH 代謝酵素遺伝子クラスターを作製し、天然株より優れた資化細菌株を育種することを目的とした。【方法と結果】 γ -HCH 分解細菌は、 γ -HCH を各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である β -keto adipate を経て代謝する。そこで、まず γ -HCH を β -keto adipate に変換するのに必要な LinA から LinF の 6 つの酵素遺伝子クラスターを作製した。この際、 γ -HCH 初発分解に作用する LinA の活性が次段階に作用する LinB の活性より相対的に強いと、より多くの dead-end 産物を生じることを考慮し、*linB* と *linA* をクラスターの先頭と最後尾にそれぞれ配置した。また、*lin* 遺伝子群の発現が、高すぎても低すぎても適当な分解細菌が創出できない可能性が考えられたため、発現強度が異なると期待される 3 種のコンストラクトを作製し、 β -keto adipate 代謝能を有し IS6100 を保持しない様々な環境細菌株に導入した。作製した人工株の γ -HCH 分解特性及び資化能を天然の γ -HCH 分解資化株と比較した結果、*lin* 遺伝子群の高いレベルでの発現が期待されるクラスターを導入した株のうち、*Sphingobium chlorophenolicum* L-1 株と *Sphingomonas sangiunis* IAM12578 株を宿主とする株が高い γ -HCH 分解効率を示し、かつ dead-end 産物を蓄積しなかった。この 2 株のうち、L-1 由来株が γ -HCH を資化できることを確認した。さらに、この 2 株を γ -HCH 汚染化土壌に接種し、汚染環境での生残性と γ -HCH 分解特性を検討している。

P1-36

画像解析を用いたアカントアメーバ位相差顕微鏡写真の動態解析

○深谷 将¹, 青木 啓太¹, 小林 実桜², 武村 政春^{1,2}

¹東京理科大学・院理, ²東京理科大学・理

E-mail: 1717706@ed.tus.ac.jp

位相差顕微鏡写真は、光学顕微鏡写真や蛍光顕微鏡写真と比べて画像解析が難しいと言われている。位相差顕微鏡の観測対象は光の強弱ではないため既存の画像解析技術が適用できない場合があり、加えて Halo や Shade-off といった解析の妨げとなる現象が起こることに起因する。一方で位相差顕微鏡は比較的安価な設備で、ラベリングや染色なしに、生きたままの細胞を観察することができるため、生物学的な適用範囲は広い。そこで本研究では、アカントアメーバの位相差顕微鏡写真を解析対象として、新たな画像処理プログラムを開発した。さらにこのプログラムにより静止画の粒子解析、およびタイムラプス画像の粒子トラッキング解析を行い、解析結果を得ることに成功した。この場合「粒子」とは、解析により画像上で一つに繋がった塊として認識されるピクセルの集合のことを指す。この粒子は、独立して動く一個のアカントアメーバ細胞や、凝集したアカントアメーバ細胞の塊などを示している。解析からは視野内に存在する粒子の数、平均サイズや平均速度を、時系列で得ることができた。また粒子の移動方向の偏りを時系列でプロットすることにより、粒子の動きの同調に関する結果も得ることができた。また粒子の分裂や、複数の粒子が重なり合っ一つの粒子になることを想定したアルゴリズムを組むことにより、アカントアメーバの動きに対応した解析を実現できた。これにより、一つの粒子の中に推定いくつのアカントアメーバが存在するか予測値を得ることができた。さらにこの解析プログラムを用いて、種々の環境に置いたアカントアメーバの動態解析を行い、結果を比較した。これにより、いくつかの巨大ウイルスに感染させたアカントアメーバの動きについて、非感染のアカントアメーバとの特徴的な違いを観察することができた。

P1-37

Isolation and characterization of a novel thermophilic purple sulfur bacterium from Nakabusa hot springs, Japan

○ Mohit Kumar Saini, Weng ChihChe, Satoshi Hanada, Marcus Tank

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

E-mail: mohitvtm@gmail.com

Purple sulfur bacteria are anoxygenic phototrophs with type 2 reaction centers that can be found in anoxic, sulfidic and illuminated habitats all over the world. However, only one truly thermophilic species, *Thermochromatium tepidum*, has been described so far. In the search for novel truly thermophilic purple sulfur bacteria we could isolate a novel purple sulfur bacterium, strain No.7, from a microbial mat (collected at 56°C) collected in Nakabusa hot springs, Japan. Cells are rod shaped and stain gram negative. They are motile, red in color and store sulfur globules inside, a key characteristic of purple sulfur bacteria that belong to the family *Chromatiaceae*. Similar to *Thermochromatium tepidum*, the novel isolate contains bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) and carotenoids as major photosynthetic pigments with a typical type 2 reaction center LH1 and LH2 complexes. Strain No.7 was able to grow photoautotrophically using sulfide as electron donor and bicarbonate as inorganic carbon source, under anaerobic and tungsten light conditions at 50°C. Growth under photoautotrophic conditions occurred at temperatures of 35-56°C with an optimum around 50°C and a pH value of 7.2. 16S rRNA gene sequence comparisons indicated that the isolate is next related to *Thermochromatium tepidum* with a pairwise similarity of only 88% nucleotide identities. This large phylogenetic distance suggests strain No.7 represents a novel genus with a truly thermophilic growth behavior. Phylogenetic analysis supported the high novelty of this purple sulfur bacterium with a long branching phylogenetic position within the family *Chromatiaceae* next to *Thermochromatium tepidum*. The novel isolate will be described as a new species by polyphasic taxonomy, soon. Sample preparation for genome sequencing has been conducted and the genome will provide more information about the thermophilic adaptation.

P1-38

Isolation and characterization of *Geomonas* species, a novel genus involved in reductive nitrogen transformation in paddy soils

○ Zhenxing Xu¹, Yoko Masuda¹, Hideomi Itoh², Keishi Senoo^{1,3}

¹Grad. Sch. of Agri., Univ. Tokyo., ²Bioproduction Research Institute, AIST, Hokkaido,

³Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo

E-mail: xuzx.ut@gmail.com

Reductive nitrogen transformation (nitrogen fixation, dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA), and denitrification) in paddy soil, driven by microorganisms, is important for sustainable rice production and environmental conservation. In our previous metatranscriptomic study of paddy soil in Japan, we found that most of gene transcripts involved in reductive nitrogen transformation were derived from the order *Deltaproteobacteria*, especially the genera *Geobacter* (the sole genus in the family *Geobacteraceae*) and *Anaeromyxobacter*, known as iron reducing bacteria. However, there has been no *Geobacter* species with a validly published name isolated from paddy soil, and their ability of nitrogen transformations also has not been reported. In this study, we successfully isolated 54 bacterial strains in the family *Geobacteraceae* from paddy soils collected in different fields in Japan using enrichment culture combined with spread plate method. Based on the 16S rRNA sequence similarities and phylogenetic analysis, the 54 isolates are separated into 4 groups, and every group represents at least one novel species in the family *Geobacteraceae*. With the further genomic analysis, we found 3 of the 4 groups consisted a novel genus in the family *Geobacteraceae*, which is obviously distinct with the genus *Geobacter*, so we proposed the novel genus with the name *Geomonas* gen. nov. In laboratory cultivation studies, the paddy soil-derived *Geomonas* strains showed nitrogen fixing and DNRA activity, as well as ferric reducing ability, consistent with annotated genome results. Further analysis of ferric reduction and nitrogen fixation using freshwater medium, we found that the higher ferric concentration could promote the nitrogen fixation of *Geomonas* strains. These results indicate that the *Geomonas* strains could be important drivers of biogeochemical cycle in paddy soil.

P1-39

嫌気性アンモニア酸化細菌“*Ca. Scalindua sp.*”の酸素同位体分別の解析

○小林 香苗¹, 福島 慶太郎², 大西 雄二², 眞壁 明子³, 矢野 翠², 押木 守⁴, 金田一 智規⁵, 木庭 啓介², 岡部 聡¹

¹北大・院工, ²京大・生態研, ³海洋研究開発機構, ⁴長岡高専・工, ⁵広島大院・工

E-mail: k-kanae625@eis.hokudai.ac.jp

環境保全や生物地球化学的物質循環を明らかにするためには、窒素循環の解明が極めて重要である。環境中の硝酸や亜硝酸の窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) は物質循環のトレーサーとして広く用いられてきた。近年、硝酸と亜硝酸の酸素安定同位体比 ($\delta^{18}\text{O}$ 値) についても、 $\delta^{15}\text{N}$ 値と同様に測定が可能となり、窒素と酸素の2軸で亜硝酸と硝酸の挙動を追跡することで、より複雑な反応を推定することが可能になってきた。窒素循環への各生物学的反応の相対的寄与を定量的に把握するためには、各プロセスの固有の窒素・酸素同位体分別 ε (反応における安定同位体比 (δ) の変化量) が不可欠である。嫌気性アンモニア酸化 (以下アナモックス) 細菌は幅広い水圏環境で検出され、脱窒と共に窒素除去へ寄与している。さらに、アナモックス反応では、二酸化炭素の固定の際に硝酸を生成するため、硝酸生成にも寄与しており、窒素循環に非常に重要な役割を担っている。しかしながら、アナモックス細菌は、増殖速度が非常に遅く培養が困難であり、反応自体も複雑であることから海洋性アナモックス細菌を含め多様なアナモックス細菌の酸素同位体分別に関する情報は皆無であった。そこで本研究では、我々の研究室で膜分離型連続培養リアクター (MBR) を用い、高度に集積培養した (> 90%) 海洋性アナモックス細菌“*Ca. Scalindua sp.*”を用いて酸素同位体分別を明らかにすることを試みた。これまでの研究で、我々は膜分離型連続培養リアクター (MBR) の流入水と流出水の濃度と窒素安定同位体比を測定し“*Ca. Scalindua sp.*”を含む3種のアナモックス細菌の窒素同位体分別 $^{15}\varepsilon$ ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$), $^{15}\varepsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$), $^{15}\varepsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) を明らかにしてきた。しかし、酸素同位体分別を解析する際には、上記の $^{18}\varepsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$), $^{18}\varepsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) の2つの分別に加えて、亜硝酸酸化反応時に水の酸素原子を一つ取り込むことによる同位体分別 ($^{18}\varepsilon \text{H}_2\text{O}$)、さらに亜硝酸と水の間では ^{16}O と ^{18}O の同位体平衡が成立しており、この時の平衡同位体分別係数 (ε_{eq}) も必要である。これらの値は、連続培養系のみでは独立して求めることができないため、 ^{18}O でラベルされた水を用いた回分実験系と、亜硝酸と水の平衡同位体分別を求めるための実験を組み合わせることにより、それぞれの酸素同位体分別の解析を試みた。

P1-40

細胞ごとに増殖速度のばらつきが大きいアンモニア酸化細菌のしなやかな生存戦略

○一色 理乃¹, 藤谷 拓嗣², 田中 大器³, 関口 哲志³, 常田 聡^{1,3}

¹早大・院先進理工, ²産総研・バイオメディカル, ³早大・ナノライフ

【背景・目的】環境中の微生物の多くは難培養であり、実験室で継代培養し続けることが困難である。本研究では、安定して培養し続けることが難しい原因として、個々の細胞レベルで増殖速度にばらつきがあるのではないかと考えた。そこで、難培養微生物の増殖速度のばらつきを純菌株で評価し、ばらつきを持つ意義を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】難培養微生物のモデルとして、アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas mobilis* Ms1 を用いた。本微生物種は、過去に複数の研究室で獲得されたがすべて継代の失敗により失われてきた難培養微生物である。はじめに、継代操作による増殖速度のばらつきと継代効率を評価した。1 培養液から均一に継代した培養液を複数用意し、継代条件を 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 継代の 4 条件で用意した。増殖速度の変動係数は、1% 継代を基準とし継代割合が減少するにつれて 2.1 倍, 2.3 倍, 2.8 倍に増加した。さらに、継代効率は 0.1% 継代までは 100% であるのに対して、0.01%, 0.001% では、92%, 66% と減少した。この結果より、*N. mobilis* 培養液には増殖速度のばらつきがあり、継代する細胞数が減少するにつれて、ばらつきは拡大し、継代が困難になることが明らかになった。次に、増殖速度のばらつきをシングルセルレベルで解析するため、マイクロ流体デバイス上で個々の細胞ごとにタイムラプス観察を行った。観察の結果、1 培養液中でも個々の細胞ごとに世代時間は 0-8 日間の間にばらつき、*N. mobilis* 細胞集団中にはシングルセルレベルで増殖速度のばらつきがみられた。また、増殖が見られたのは非凝集細胞のみで、凝集細胞では全く増殖が見られなかった。続いて、増殖能の違いをもたらし遺伝子発現を明らかにするため、増殖能のない凝集細胞と増殖能を持つ非凝集細胞を区別して分取し、RNA シークエンス解析を実施した。遺伝子発現を比較した結果、非凝集細胞では電子伝達系やリボソームタンパク質などエネルギー生産、およびタンパク質翻訳にかかわる遺伝子の発現が亢進し、凝集細胞では運動性や走化性にかかわる遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。したがって、*N. mobilis* の細胞集団は増殖と環境適応を分業させ、増殖による集団の拡大と、変動する環境への適応による種の存続を両立させていることが推測された。

P1-41

深部地下圏環境におけるメトキシ芳香族化合物分解メタン生成共生系の発見

○坂本 幸子¹, Masaru Konishi Nobu², 眞弓 大介³, 玉澤 聡⁴, 五十嵐 雅之⁵, 若山 樹⁵, 前田 治男^{3,5}, 坂田 将³, 鎌形 洋一², 玉木 秀幸^{1,2}

¹筑波大・院生命, ²産総研・生物プロセス, ³産総研・地圏資源, ⁴H-RISE, ⁵INPEX

E-mail: sakamoto-s@aist.go.jp

メトキシ芳香族化合物 (MAC) は、リグニン由来の物質であり石炭層や堆積性有機物などに含まれ、深部地下環境や泥炭環境など地球上の様々な場所に存在する。近年、メタン生成アーキアが石炭中の MAC を基質としてメタンを生成する新たな生物機能が発見され、MAC 利用性のメタン生成菌が地下の天然ガス資源の成因に関与している可能性が示唆された。一方で、深部地下環境において MAC の動態に関与する微生物の実態は不明な点が多い。実際に、上述の MAC 利用性のメタン生成アーキアは 1 種のみでしか知られておらず、また無酸素環境下で MAC を利用可能な細菌に関する知見もホモ酢酸生成細菌等に限定されている。そこで、本研究では、深部地下環境において MAC 分解を担う未知微生物を探索し、その生理生態機能を解明することを目的とした。深部地下油ガス田環境から採取した油層水試料を用い、MAC を基質として集積及び分離培養を行った結果、新規嫌気性細菌の純粋分離に成功した。16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析の結果、本単離株は *Firmicutes* 門に属するが、近縁種との相同性が 87.5% 以下と低く、系統的新規性が高かった。本株を MAC 分解細菌と予想し、ゲノム解析を実施した。既知の嫌気性 MAC 分解細菌は、Wood-Ljungdahl (WL) 経路と呼ばれる二酸化炭素固定経路を利用し、MAC から酢酸を生成する。一方で、本株のゲノム上には WL 経路の一部しか存在せず、また、ゲノム情報から酢酸ではなくギ酸と水素を生成している可能性が示唆された。このことから、本株は、ギ酸・水素資化性メタン生成菌との共生下で MAC を分解しているのではないかと考えた。培養実験の結果、本株は予想通り、単独では MAC を単一基質として利用しなかった。そこで、ギ酸・水素資化性メタン生成菌との共培養実験を行ったところ、本株とメタン生成菌の顕著な増殖とメタン生成が確認されたことから、本株はメタン生成菌との共生系において MAC を分解する嫌気共生細菌であることが明らかとなった。無酸素環境下において MAC を分解する細菌は、いずれも単独で MAC を単一基質として利用可能であり、メタン生成菌との共生系で MAC を分解する共生微生物はこれまでに報告されておらず、今回が初めての発見である。この MAC 分解を担う新規メタン生成共生系は、深部地下圏環境において新たな嫌気共生系として存在しうる可能性を示し、今後、その共生機構及び生理生態機能をさらに詳細に解明する予定である。

P1-42

環境ストレスが嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) 細菌の形態と活性に与える影響

○山下 柚子¹, 上垣内 厚志¹, 張 磊², 小林 香苗¹, 岡部 聡¹

¹北海道大・院工, ²University of Washington

【目的】嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) 細菌は原核生物でありながら細胞内小器官アナモキソソームを持つ。ATP 合成酵素がアナモキソソーム膜上に局在していることから、通常の細菌とは異なり、アナモックス細菌はアナモキソソーム膜を介してエネルギー代謝を行うと考えられている。アナモキソソーム膜は凹凸に富み、この凹凸部分にアナモックス反応に関与する酵素が多く存在することも示唆されている。そこで我々は、アナモキソソームの形態が代謝活性に関係しているのではないかと考えた。本研究では、基質の制限および塩分というアナモックス活性に影響を及ぼすような環境ストレスを与えて細胞構造を比較し、アナモックス活性と形態の関係を明らかにしようと試みた。

【方法】膜分離型バイオリアクター (MBR) にアナモックス細菌 *Ca. B. sinica*, *Ca. Scalindua* sp. をそれぞれ植菌し、地下水に無機塩を加えた人工合成培地を連続供給して培養した。窒素負荷を徐々に上昇させ、基質濃度の制限を受けずに増殖する状態 (対数増殖期)、一定の窒素負荷のもとで増殖が停止した状態 (定常期) を作った。定常期の菌体をアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素を含まない培地で 42 日間培養したものを死滅期とした。また *Ca. B. sinica*, *Ca. Scalindua* sp. をそれぞれ MBR に植菌し、1% の塩分濃度に馴致した。更に *Ca. B. sinica* は 3%, *Ca. Scalindua* sp. は 0% と 6% で 10 日間の回分培養を行った。各増殖期・培養条件の細胞を透過電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

【結果と考察】大腸菌等では飢餓や塩分などのストレスにより細胞の大きさや形状が変化することが知られているが、本研究では細胞の外形に顕著な変化はみられなかった。一方、環境ストレスを受けた細胞でアナモキソソーム膜の凹凸が減少する傾向がみられた。TEM 画像からアナモキソソームの断面積と周長を求め、 $(4\pi \times (\text{断面積}) \div (\text{周長}))$ で表される円形度を凹凸の指標としたところ、円形度とアナモックス活性の間に相関が認められた。*Ca. Scalindua* sp. では低塩分濃度による溶菌等の影響で、各塩分濃度における活性と円形度との間に明確な関係を見いだせなかった。本研究の結果はアナモキソソームの形態変化によって活性が制御されている、あるいは活性に関わるタンパク質等の影響でアナモキソソームの形態が変化している可能性を示唆している。変形が生じる機構については今後さらなる調査・検討が必要である。

P1-43

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における概日時計に 制御された酸化ストレス耐性

○田中 謙也¹, 中西 周次^{1,2}

¹大阪大・院基礎工, ²大阪大・太陽エネ研セ

E-mail: tanaka@rcsec.chem.es.osaka-u.ac.jp

酸素発生型光合成生物は、外界の光や温度などの変化によって不可避免的に発生する過剰量の活性酸素種 (ROS) に対処する様々な機能や酵素群を発達させてきた。一方、昼夜で規則的に変化する外部環境に効率的に適応するために、光合成生物は概日時計を備えている。ROS 発生による酸化ストレスに対処するための各々の酵素群や機構は詳細に知られている一方、概日時計がそれらに与える影響や役割についてはよく分かっていない。そこで本研究では、多くの遺伝子発現が概日時計によってコントロールされていること、および過酸化水素除去酵素であるペルオキシレドキシンのレドックス状態が概日リズムを示すことが知られているシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 において、概日時計と酸化ストレス耐性との相関を解明することを目的とした。

本研究では、メチルピオロゲン (MV) 存在下で光を照射させることで任意のタイミングで ROS を発生させ、概日時計の酸化ストレス耐性への影響を調べた。その結果、MV による酸化ストレスを加えたあとの酸素発生速度は概日リズムを示すことが分かった。一方、PSII に対する電子受容体存在下での酸素発生速度は酸化ストレスを加える前後でほとんど変化せず、概日リズムを示さなかった。このことは MV による酸化ストレスが PSI 選択的に起こり、PSI 周りの ROS 除去機能が概日時計によってコントロールされていることを示唆している。さらに MV による酸化ストレスを同様に加えたあとのコロニー形成単位 (CFU) も概日リズムを示すことが明らかになった。以上の結果は、光合成活性や生存率といった巨視的な形質に影響するレベルで、酸化ストレス耐性が概日時計によりコントロールされていることを示している。

P1-44

α -アミノ酸添加による *Chitinophaga* 属細菌の N_2O 消去亢進効果の検証

○高津 祐太¹, 長田 彬², Sharon Yu Ling LAU³, 橋床 泰之¹

¹北大・院農, ²北大・農, ³Sarawak Tropical Peat Research Institute

E-mail: record@eis.hokudai.ac.jp

【背景】亜酸化窒素 (N_2O) は、等モルあたり二酸化炭素の約 300 倍もの強さを示し、21 世紀最大のオゾン層破壊原因物質との指摘もある厄介な温室効果ガスである。農地や人為的に攪乱された酸性土壌からの大量に放出される N_2O は、地球規模での気象変動に大きなインパクトを与えており、その生成抑制と大気からの効率の良い削減は極めて困難とされている。高い N_2O 放出能を示す土壌の微生物群集には、硝酸塩あるいはアンモニウム塩のみを窒素源とした培地でも密閉容器内に N_2O は放出されず、逆に無窒素培地で大気レベルの N_2O (400 ppb) を完全にゼロレベルにまで消去するものがしばしば見出される。これら N_2O 消去微生物として、 N_2O を菌体に取り込むものを分離し、同定にも成功している。本実験では、各種 α -アミノ酸を与え、当該細菌の N_2O 消去活性に連動した応答から、 N_2O 消去経路の解明に迫ろうとした。【方法】本実験では、北海道のコーン畑黒ボク土壌から分離した N_2O 消去細菌 *Chitinophaga* spp.SAcf-1 株を使用した。Winogradsky 無機塩溶液を基本培地とし、炭素源に 0.5% (w/v) スクロース、窒素源には N 原子が 5 mM になるよう α -アミノ酸を添加した。培地はガスクロバイアルに 10 ml ずつ分注し、菌体懸濁液を 100 μ l 接種した。ヘッドスペース (22.5 ml) に N_2O を終濃度 10000 ppmv になるよう封入後、25°C 暗所で培養し、1 週間後の N_2O 濃度を ECD-ガスクロマトグラフィーで測定した。また、 N_2O 消去亢進が確認された α -アミノ酸については、それらの濃度を 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM に振り、炭素源あり/なしの条件下で N_2O 消去試験を行った。加えて、 $K^{15}NO_3$ 含有液体培地で前培養し、菌体タンパク質とアミノ酸の相当量が ^{15}N ラベル化された菌体に $^{14}N_2O$ を消去させた時に ^{15}N が ^{14}N で優先的に希釈されるアミノ酸を ESI-HR-MS で特定し、 N_2O 代謝経路の解明を試みた。【結論】一部のアミノ酸の添加により、 N_2O 消去が大きく亢進され、特に 5 μ M L-ヒスチジン添加 (0.5% sucrose w/v 存在下) による N_2O 消去活性の亢進効果 (1 week 以内に 10000 ppmv N_2O がほぼゼロになる) が明らかになった。加えて、5 μ M L-ヒスチジン添加による菌体増殖効果を OD_{660} で求めた値は他の α -アミノ酸とほぼ同レベルであったため、L-ヒスチジン代謝経路が N_2O 消去経路の賦活化に連動していることが強く示唆された。

P1-45

嫌気性原生動物 *Cyclidium* sp. 細胞内に共生可能なメタン生成古細菌の種の特定

○平片 悠河¹, 幡本 将史¹, 渡利 高大¹, 山口 隆司¹, 押木 守², 荒木 信夫², 延 優³

¹長岡技科大, ²長岡高専, ³産総研

【目的】嫌気性の原生動物の細胞内には水素資化性メタン生成古細菌が共生しており、原生動物細胞内で発生した水素を利用しメタンを生成していることが報告されている。これまで様々な種の原生動物とメタン生成古細菌による共生が報告されているが、その共生の組み合わせに規則性はなく、細胞内共生が構築される条件は明らかにされていない。そこで本研究では、細胞内にメタン生成古細菌を共生させている嫌気性原生動物 *Cyclidium* sp. を用いて、どのような種のメタン生成古細菌が共生可能かを調査した。【方法】まず、2-プロモエタンスルホン酸 (BES) の添加によって *Cyclidium* sp. 細胞内の共生メタン生成古細菌を除去した。その後、共生メタン生成古細菌を除去した *Cyclidium* sp. を、*Methanobacterium beijingense*、*Methanospirillum hungatei*、*Methanosaeta concilii*、*Methanosarcina barkeri* の4種のメタン生成古細菌とそれぞれ共培養実験を行った。メタン生成古細菌が *Cyclidium* sp. 細胞内に取り込まれ、さらに分解されずに生存し続けるか否かは FISH 法によって確認した。【結果】共培養実験の結果、*M. beijingense*、*M. hungatei* の共培養系では *Cyclidium* sp. 細胞内から古細菌由来の蛍光が確認され、細胞内共生が構築されたことが明らかとなった。細胞内共生が構築された *Cyclidium* sp. は、継代培養を繰り返しても共生は失われず、メタン生成も確認された。*M. beijingense* は *Methanobacteria* 綱、*M. hungatei* は *Methanomicrobia* 綱に属するメタン生成古細菌であり、*Cyclidium* sp. は網レベルで異なる種のメタン生成古細菌であっても、細胞内共生を構築し得ることが明らかとなった。一方で、*M. concilii*、*M. barkeri* は細胞内に取り込まれず、共生は構築されなかった。*M. concilii* は酢酸を主に資化する種であり、細胞内共生において重要な水素除去ができなかったため、共生が構築されなかったと考えられる。一方で *M. barkeri* のように水素を資化可能な種であっても共生が構築されない場合が存在し、水素資化能以外にも細胞内共生の構築条件が存在すると考えられた。

P1-46

プロファージ遺伝子による微生物間コミュニケーションの制御

○安田 まり奈¹, 森永 花菜², 尾花 望³, 野村 暢彦^{4,5}, 豊福 雅典^{4,5}

¹筑波大院・生命環境科学研究科, ²産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門,

³筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター, ⁴筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター,

⁵筑波大・生命環境系

細菌は細胞外にシグナル物質を分泌し、周囲のシグナル物質を認識することで、微生物間相互作用を行っている。近年我々は、*Paracoccus denitrificans* が生産する疎水性の高いシグナル物質 C₁₆-HSL が、膜小胞 (MV) に内包されて放出されていることを報告した (M Toyofuku *et al.* 2017. ISME Journal)。水中での単純拡散が困難となる疎水性シグナル物質 C₁₆-HSL は、MV に内包されることでその拡散性が向上されると考えられる。つまり、この C₁₆-HSL の拡散の鍵となるのは MV 産生であり、この MV 産生機構の理解が微生物間相互作用の理解につながると考えられる。そこで、*P. denitrificans* の MV 産生機構を解明することを本研究の目的とした。また、我々は *Pseudomonas aeruginosa* において、集団中の一部の細胞が溶菌することによって MV が産生される新奇 MV 産生機構を発見した (Turnbull, Toyofuku *et al.* 2016. Nature Communication)。この MV 産生機構は DNA ストレスによって誘導され、プロファージ領域に存在する溶菌遺伝子を必要とする。多くの細菌はゲノム上にプロファージ領域が保持されていることから、この MV 産生機構は *P. denitrificans* を含むほとんどの細菌に共通したものであることが予想された。

DNA ストレスを与える薬剤 MMC を用いて、*P. denitrificans* におけるストレス条件下での MV 産生能を解析したところ、ストレス量に応じた MV 産生誘導が見られた。そこで、ストレス条件下で産生された MV に含有される DNA の全ゲノムシーケンスを行ったところ、MV にはプロファージ領域由来の遺伝子が濃縮されていることが明らかとなった。さらに、濃縮されていた遺伝子の中には、プロファージ遺伝子である推定溶菌遺伝子が存在していた。この溶菌遺伝子の欠損株を作製し、ストレス条件下での MV 産生能を解析したところ、野生株で見られた MV 産生誘導が見られなくなった。また、このストレス条件下では、多量の C₁₆-HSL が MV とともに上清中へ放出されることが分かった。

プロファージは、細菌ゲノム上に存在する溶原ファージであり、環境変化に応じて発現して細胞の溶菌を引き起こす。この溶菌に依存した本 MV 産生機構では、シグナル物質 C₁₆-HSL を一気に放出し、細菌のシグナル伝達を急速に活性化できることが予想される。本 MV 産生機構によって、溶原ファージが微生物間相互作用に干渉している可能性が示唆された。

P1-47

ショットガンメタゲノム解析による厚岸湖アマモ群落の底泥における亜酸化窒素還元微生物の群集構造解析

○中川 達功¹, 石川 直央也¹, 須藤 健吾¹, 森川 翠¹, 宮本 優貴¹, 神宮寺 賢¹, 富澤 璃乃¹, 土屋 雄揮¹, 上田 眞吾¹, 福井 学², 高橋 令二¹

¹日大・生資, ²北大・低温研

E-mail: nakagawa.tatsunori@nihon-u.ac.jp

【目的】北海道厚岸湖アマモ群落内の底泥には、亜酸化窒素 (N₂O) を吸収するはたらきがあることが明らかになってきた。さらに、N₂O還元微生物 (*nosZ* clade II) が非アマモ群落の底泥に比べアマモ群落内底泥では多いことも明らかになってきた。しかし、N₂O還元微生物の構成メンバーの特定には至っていない。そこで、次世代シーケンサーを用いたN₂O還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を標的としたショットガンメタゲノム解析により培養前後の底泥のN₂O還元微生物の構成メンバーを調べた。【方法】2015年7月に北海道厚岸湖の底泥 (アマモ群落と非アマモ群落) をコアサンプラーで採取した。表層0cmから4cmを均一に混ぜた底泥と海水を血清ビンに添加し、10日間20℃暗所で培養を行った。アマモ群落と非アマモ群落の底泥に対して1) 塩化アンモニウム無添加、2) 塩化アンモニウム添加1 mM、3) 100% N₂O添加0.34 mLの3つの実験区を設けた。培養前と培養後の底泥からDNAを抽出後、Nextera DNA Library Prep Kitを用いて、ショットガンメタゲノム解析用のライブラリーを作製した。インデックスが付加された各DNA断片試料の塩基配列はMiSeq V2 reagent kitを用いてMiSeqで解析した。CLC Genomic Workbenchを用いて*NosZ*アミノ酸配列データベースとblastx解析を実施し、E-valueが10⁻¹⁵以下のDNA断片を*nosZ*遺伝子としてライブラリーから抽出した。【結果】ショットガンメタゲノム解析の結果、*nosZ*-clade IIの*Dechloromonas-Magnetospirillum-Thiocapsa*系統の硫黄酸化バクテリア (*Gammaproteobacteria*) と*Bacteroidetes (Flavobacteriia)* がアマモ群落と非アマモ群落の両方の砂泥において主要な構成メンバーであった。続いて、*nosZ*-clade Iの*Alphaproteobacteria*が主要な構成メンバーであった。アマモ群落のN₂Oを添加した培養系のみから、*Epsilonproteobacteria*も主要な構成メンバーとして検出された。アマモ群落の底泥は非アマモ群落の底泥よりN₂Oを吸収した事や*nosZ*-clade IIに属するN₂O還元微生物が多かった事からも、アマモ群落底泥におけるN₂O還元微生物の沿岸域N₂O軽減への大きな貢献が示唆された。

P1-48

18S rDNA 遺伝子のメタゲノム解析により明らかになった微小真核生物の群集構造とその多様性：黒潮周辺海域の海面から深海まで

○寒川 清佳¹, 長井 敏¹, 日高 清隆¹, 平井 惇也², 清水 勇吾¹, 廣江 豊³, 日下 彰¹, 瀬藤 聡¹

¹水産機構・中央水研, ²東大・大海研, ³水産機構・西海水研

E-mail: ssogawa@affrc.go.jp

1. 背景と目的 細菌と植物プランクトンは海洋食物網の土台となる重要な生物である。海洋生態系には植物プランクトンが生産した有機物を基礎とする捕食食物連鎖と、生物由来の有機排出物を利用・分解する細菌が原生動物に捕食される食物連鎖 (微生物ループ) が存在し、いずれも動物プランクトンを介してより高次栄養段階の魚類等に転送される。多種多様な魚類の産卵・成育場となっている黒潮周辺海域は、貧栄養海域のため小型のプランクトンが多く、従来の顕微鏡下での分類・同定は困難だった。次世代シーケンサーなど分子生物学的手法の進化により、水中環境に浮遊する生物・生物由来のDNA (環境DNA) の配列を解析することで、網羅的に生物群集を把握することが可能になった。本研究では、黒潮周辺海域で採集された環境DNAの18S-rDNA遺伝子による微小真核生物群集の構造解析を行い、各群集の海面から深海までと季節毎の出現特性を把握する。また海洋環境の変動に応じて群集がどのような変化をするか調べる。2. 材料と方法 2015-2016年の海洋調査より、沿岸から沖合にかけて黒潮を横断する全17地点で、海面から深海の環境DNAと環境データを採取した。環境DNAは0.2 μmフィルターで濾過した後-30℃で保管した。抽出したDNAからPCR法で18S-rDNA遺伝子を増幅した後、次世代シーケンサーMiSeqを用いて網羅的に配列を決定した。群集構造と多様性解析にはPRIMER v7とPERMANOVA+ソフトを使用した。3. 結果と考察 全110試料から得られた2175OTUsの内、アルベオラータが約半分の割合を占めた。全リード数ではアルベオラータとリザリアが各々3-4割を占めた。リード数を元に微小真核生物群集のBray-Curtis類似度を用いたnMDSとANOSIM解析を行ったところ、群集は水深100mを境に優位に異なった：アルベオラータは全深度で3-5割と大きく、50m以浅ではオピストコンタ、100m以深ではリザリアの割合が大きくなった。DISTLMとdbRDA解析を行い群集の違いを環境変数で説明したところ、11つの環境変数の内6つと群集との間で優位な関係があることを示した (P=0.001)。1軸は変数の95% (全変数の71%) を優位に説明し、水温と強い相関が見られた。重ねたベクターにより栄養塩、特に珪酸が水深とともに増えることが示された。

P1-49

ピコ藻類を捕食する外洋性プロティストの分子系統解析およびその時系列変化

○松田 知樹¹, 柏山 祐一郎¹, 四本木 彰良¹, 日高 清隆², 瀬藤 聡²

¹福井工業大学, ²中央水産研究所

E-mail: sakura54335433@gmail.com

外洋の貧栄養海域においては、ピコ藻類が基礎生産の大部分を担っていることが知られている。ピコ藻類の主要な一次捕食者と考えられるプロティストは、ピコ藻類が有するクロロフィルを光毒性の無いCPE類に代謝することが分かってきたが (Kashiyama et al., 2019, ISMEJ), その分類学的な特徴や多様性については未解明である。そこで本研究では、御前崎沖太平洋の黒潮流軸以南 (北緯27~30度, 東経138度) において表層水を採取し、培養された *Prochlorococcus* sp. (NIES-2882) ないし *Prochlorococcus marinus* (NIES-2087) を船上で添加して20°C弱光条件で10日間培養し、回収した懸濁物中の total DNA から SSU 18S rDNA のユニバーサルプライマーを用いて得られたPCR産物を大腸菌にクローニングして、44 クローンからシーケンシングを行なったところ、6種類のプロティスト (*Neoparamoeba*, *Goniomonas*, *Paraphysomonas*, *Telonema*, *Amastigomonas* および *Hemistasia*) の配列が認められた。また、同様の培養物からプロティストの単離・培養を試み、2種類の chrysophyceae (Stramenopiles) (*Paraphysomonas* sp. MZD003株, および chrysophyceae の基部で分岐する MZD008株), 3種類の Opalozoa (Stramenopiles) (*Cafeteria* sp. MZD009株および *Bicosoecida* spp. SNK004株, 009株), 2種類の Cercozoa (Rhizaria, Endomyxa-like MZD015株および, *Cercomonas* sp. MZD 016株), Kinetoplastea-like MZD004株 (Euglenozoa, Discoba) の8種類のナノべん毛虫および、1種類の amoeba (*Neoparamoeba* sp., Discosea, Amoebozoa, YHK003株) を得た。さらに本講演では、*Prochlorococcus* を添加した表層水について、3日目及び10日目に一定量回収し、18S rRNA アンプリコン解析を行い、プロティストの多様性について時系列変化の解析をおこなった結果もあわせて議論を行なう。

P1-50

ストレス負荷で魚類の腸内細菌叢は変化するか？ -糞便を用いた非侵襲的健康診断手法の開発-

○伊藤 真奈, 羽野 健志, 内田 基晴

水産機構・瀬水研

E-mail: nozakim@affrc.go.jp

【目的】近年、生物体の健康状態が腸内細菌叢によって創造される腸内環境と密接に関連していることが明らかにされつつあり、ほ乳類等ではストレスにより腸内細菌叢の構成が変化することが知られている。しかしながら、魚類においては両者の関係は明らかになっていない。そこで我々は、腸内環境の通行手形でもある糞便に着目し、糞便を用いた非侵襲的健康診断手法の開発に取り組んでいる。本研究では、有害化学物質の曝露と過密養殖という種類の異なる2つのストレスを魚にそれぞれ負荷し、環境ストレスの負荷によって魚類糞便中の細菌叢が変化するかを調べ、さらにストレスの種類によって糞便の細菌叢が異なるかを比較解析した。【方法】養殖主要魚種であるマダイ稚魚 (*Pagrus major*) を用い、2つのストレス負荷試験 (有害化学物質曝露、過密養殖) を実施した。試験は室内水槽にて、水温20°C, 14h 明期10h 暗期の条件下で行った。有害化学物質曝露試験では、被検物質として石油毒性成分であるフェナントレン (Phe) を選定した。マダイに Phe を2週間曝露し、飼育1、2週目に糞便を採取した。過密養殖試験は、低密度 (約4.6kg/m³) と高密度 (同14kg/m³) を再現した水槽内で3週間行い、飼育1、3週目に糞便を採取した。マダイ糞便からDNAを抽出後、次世代シーケンサー (Miseq) を用いて細菌の16SrRNA 遺伝子の塩基配列を取得することで微生物群集構造を解析した。【結果】マダイ糞便の細菌叢は Gammaproteobacteria 綱が優占し、その他、Alphaproteobacteria 綱、Flavobacteriia 綱および Clostridia 綱が多く検出された。有害化学物質曝露試験における細菌叢を主座標分析した結果、飼育日数およびストレスの有無によって異なるクラスターを形成した。1週間目の曝露区では、Gammaproteobacteria 綱の割合が増加し、多様性が低くなる傾向が認められた。一方、2週間目の曝露区では Alpha および Deltaproteobacteria 綱等が占める割合が増加し、細菌叢の多様性が増加した。過密養殖試験の結果、高密度で飼育することで Gammaproteobacteria 綱が増加する傾向が認められた。なかでも飼育3週間目の高密度区では90%以上が *Vibrio* 属で占められており、細菌叢の多様性も著しく低下した。以上の結果から、魚類であるマダイにおいてもストレスの負荷に対応して糞便の細菌叢が変化することが明らかとなり、その程度や変化の傾向はストレスの種類に依存するものと推察された。

P1-51

Eukaryotic phytoplankton contributing to seasonal blooms and carbon export revealed by tracking sequence variants in the western North Pacific

○Takuhei Shiozaki¹, Yuu Hirose², Koji Hamasaki³, Ryo Kaneko⁴, Naomi Harada¹

¹JAMSTEC, ²Dep. of Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. of Tech., ³Atmos. Ocean Res. Inst., Univ. of Tokyo,

⁴Arctic Environ. Res. Cntr., Ntl. Inst. of Polar Res.

Greater diversity of eukaryotic phytoplankton than expected was revealed recently through molecular techniques, but little is known about their seasonal dynamics and fate in the open ocean. Here, we examined size-fractionated eukaryotic phytoplankton communities from the surface to abyssopelagic zone (5,000 m) throughout the year, by tracking sequence variants of the 18S rRNA gene in the western subtropical North Pacific. The winter-spring algal bloom was seeded by allochthonous, rather than autochthonous, diatoms belonging to coastal species with the potential to form resting stage cells, which were exported efficiently to the abyssopelagic zone. In large phytoplankton community ($\geq 3 \mu\text{m}$), prasinophytes putatively assigned to *Pseudoscourfieldia marina* were also major constituents of the winter-spring algal bloom and their relative abundance in deep water is similar with or higher than diatoms. In addition, Mamiellophyceae dominated in picophytoplankton community ($< 3 \mu\text{m}$) during the bloom period and shared major fraction in the abyssopelagic zone. These results firstly showed the evidences of larger contribution of prasinophytes in the sinking flux of phytoplankton-derived organic matters than ever expected. Our molecular survey showed that these previously overlooked phytoplankton species contribute significantly to the algal bloom and biological carbon pump in the subtropical open ocean.

P1-52

Relationships between the composition of bacterioplankton communities and subsurface methane maximum in lakes

○Santona Khatun¹, Hisaya Kojima², Yoshiki Ikarashi¹, Kana Yamanami¹, Kenta Tanaka³, Ryuichiro Shinohara⁴, Tomoya Iwata¹

¹Univ. Yamanashi, ²Hokkaido Univ., ³Univ. Tsukuba, ⁴NIES

Freshwater methanogenesis has become paradox as with the presence of supersaturated methane in aerobic lake waters. Methane production in oxic lake waters is considered to be produced by planktonic microbes under phosphorus-starved conditions. These microbes having C-P lyase gene are able to produce CH₄ aerobically by utilizing dissolved organic phosphorus such as phosphonates under the phosphate-starved conditions. However, the organisms responsible for aerobic methane production in lake ecosystems are still unknown.

We collected water samples at the different depth of nine lakes throughout Japan to examine the existence of subsurface CH₄ maximum in summer. Further, we analysed the community structure of planktonic bacteria in lake water samples through PCR amplification of bacterial 16S rRNA genes followed by sequencing analysis, where aerobic methane production was observed at subsurface maximum of the lakes.

The subsurface CH₄ maximum was observed at thermocline within the upper 10-15m of the nine lakes. The amplicon sequencing analyses of bacterial community detected about 7,229 OTUs of bacteria including 58 phyla from epilimnetic, metalimnetic (i.e., thermocline), and hypolimnetic samples of all the study lakes. In thermocline, the relative abundance of Proteobacteria (30%) was dominant, followed by Actinobacteria (20%), Verrucomicrobia (18%), Cyanobacteria (14%), Bacteroidetes (13%) and the others (5%). Among them, Proteobacteria, Actinobacteria, and Cyanobacteria have C-P lyase gene in their cells. Moreover, cyanobacteria tended to increase in thermocline where the highest CH₄ peak was observed, suggesting that the P-starved planktonic cyanobacteria might have a connection to DOP decomposition including phosphonates, thereby producing CH₄ in oxygenated lake waters. Further research and data processing is still ongoing to identify the specific microbes that could govern aerobic methane production in freshwater lakes.

P1-53

深海熱水系に形成される電場と電気微生物生態系の関係性

○山本 正浩^{1,2}, 川田 佳史³, 鹿島 裕之¹, 設楽 真莉子², 下新井田 康介^{1,2}, 谷崎 明子¹, 笠谷 貴史¹, 野崎 達生¹, 高井 研¹
¹海洋研究開発機構, ²横浜市立大学, ³東北大学

E-mail: myama@jamstec.go.jp

微生物の中には電気を直接のエネルギー源として利用できる、いわゆる「電気栄養性」の能力を持つものがあることが知られている。また、深海熱水噴出域では発電現象が生じているため、このような環境中には電気栄養性の微生物が生息する可能性が高いと考えられる。我々は、深海熱水噴出域での調査において、電気化学的な探査手法を用いて電場の分布の計測を行った。その結果、深海熱水噴出域では熱水噴出孔からは離れていても電場の強い場所がいくつかあった。これらの強電場の空間の海底から岩石を採取したところ、その岩石試料の一つが極めて高い導電性を示した。また岩石試料の微生物群集解析を行ったところ、熱水噴出孔近傍の化学合成生態系とは異なる微生物群集構造が観察され、その一部は細胞外電子伝達経路を有する電気栄養性微生物であることが示唆された。以上の結果は、熱水噴出域には噴出孔近傍の化学合成生態系とは別に、強電場空間での電気エネルギーを利用する生態系が存在する可能性を示している。またその探査に電気化学的手法が有効であると考えられた。

P1-54

南極の光合成微生物マットのメタ 16S/18S 解析

○広瀬 侑¹, 塩崎 拓平², 大谷 真広³, 浴 俊彦¹, 原田 尚美²

¹豊橋技科大・院・工, ²海洋研究開発機構, ³新潟大・院・農

E-mail: hirose@chem.tut.ac.jp

南極に生息する光合成微生物は、栄養分の不足、低温による凍結ストレス、強光・紫外線等の光ストレス、極夜による光エネルギー枯渇といった様々な厳しい環境変化に順応する必要がある。このように、南極は生命活動を維持するためには厳しい環境であるが、実際に様々な光合成生物が生息し、一次生産者としての役割を果たしている。光合成生物の特徴として、光を吸収・遮蔽するための様々な色素を保有し、その結果として、見た目に鮮やかな色を呈した微生物マットを形成する。本研究では、これらの微生物マット生態系の多様性や成り立ちの理解を目的とし、第 60 次南極地域観測隊の陸上生物班に同行し、昭和基地から数十 km 離れた位置にある湖沼（雪鳥池、菩薩池、すり鉢池、小鉢池）の近辺にてサンプリングを行った。16 点の光合成生物微生物マットを採取して DNA を抽出し、次世代シーケンサー MiSeq を用いた 16S および 18S rRNA 菌叢解析を行った。データ解析は QIIME2 および Phyloseq パッケージを使用した。14 点の試料は原核光合成生物を主体とする微生物マットであり、糸状性のシアノバクテリアが多く検出された。一方、単細胞性のシアノバクテリアはほとんど検出されなかった。2 点の試料は、緑藻もしくはクリプト藻など、特定の真核藻類が優先した微生物マットであった。本ポスター発表では、系統解析および多様性解析の詳細についても紹介し、南極における光合成生物生態系の成り立ちを議論する。また、解析パイプラインの詳細や、解析の注意点についても議論する。

P1-55

Nitrate and light dependent growth of thermophilic microbial communities dominated with *Chloroflexus aggregans* obtained from Nakabusa hot springs

Shigeru Kawai, ○Katsumi Matsuura, Shin Haruta

Dept. of Biol. Sci., Tokyo Metropolitan Univ.

E-mail: sk.harmonics.1210@gmail.com

Cyclings of sulfur, hydrogen, and carbon in the thermophilic microbial communities of Nakabusa hot springs have been largely revealed in the last decade. They have been shown to be related to each other. Kawai et al. have recently shown that sulfide is oxidized to sulfate by symbiotic cooperation of two species of photoautotroph and chemoautotroph. Based on the genomic information of environmental samples, many electron transfer systems may function by similar cooperation of different microbes. Nishihara et al. have shown nitrogen fixation in the chemosynthetic mats of Nakabusa, but other metabolisms of nitrogen compounds have been poorly studied in thermophilic environments higher than those inhabited by cyanobacteria. In this study, we tried to obtain cooperative thermophilic microbial consortia to utilize nitrate under photosynthetic conditions from the microbial mats dominated by *Chloroflexus aggregans*. *C. aggregans* was described that it cannot utilize nitrate.

Microbial mats at 65°C were obtained from Nakabusa hot springs. The mat samples were inoculated in media containing nitrate or nitrite, dinitrogen, dihydrogen, lactate, carbon dioxide, and sulfide. No other carbon, sulfur, and nitrogen sources were not added in the media. With nitrate under illumination at 55°C, colored microbial growth was observed, and the growth continued after transfers. Nitrite did not support the growth, and illumination was necessary for the growth. Lactate was also necessary for the growth. A large decrease in nitrate concentration was observed in the culture medium without gas generation. From these results, we concluded that nitrate is used in the microbial consortia with *C. aggregans* and additional species that use nitrate possibly for dissimilatory reduction to ammonium working in the nitrogen cycle in Nakabusa. Thermophilic nitrate reducers seem also interesting from the evolutionary viewpoint since nitrate respiration has been suggested to precede to oxygen respiration.

P1-56

新規な多機能植物成長促進細菌のゲノム解析と機能性遺伝子の探索

○田代 幸寛¹, 浅原 理央¹, Clament Fui Seung Chin^{1,2}, Mohd. Huzairi Mohd. Zainudin³, Norhayati Ramli³, 酒井 謙二¹

¹九大院・農, ²Univ. Malaysia Sabah, Malaysia, ³Univ. Putra Malaysia, Malaysia

E-mail: tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】植物成長促進細菌 (PGPB) の植物成長促進能は不溶性無機塩可溶性能および抗カビ活性などの植物病原菌増殖阻害能に大別される。先行研究にて、25 株の機能性 PGPB を分離・同定し、そのうちの数株はこれまでにほとんど報告のないパームヤシ植物病原糸状菌 *Ganoderma boninense* に対する抗カビ活性を有する新規な PGPB であることが判明した (Chin et al., J Biosci Bioeng, 2017)。しかし、これらの PGPB がどのような機能性遺伝子を持つかは明らかにされていない。そこで本研究では、選定した新規 PGPB 5 株とその基準株 3 株のドラフトゲノム解析を行い、機能性遺伝子、特に抗カビ活性に関する遺伝子の同定を行うことを目的とした。【方法】*Citrobacter sedlakii* CESi7 株、CE9 株および基準株、*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* B3 株および基準株、*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TSASi1 株および基準株、*Bacillus tequilensis* CE4 株の計 8 株を MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 社) を用いてドラフトゲノムシーケンスを行った。その後、得られたシーケンスデータに関してアセンブリ、アノテーションを行い、各 PGPB の植物成長促進能および抗カビ活性に関わる遺伝子群を推定した。【結果】シーケンス解析の結果、8 株全てでドラフトゲノムを得ることができた。アノテーションを行ったところ、アンモニア、シデロフォア生産などの植物成長促進関連遺伝子が基準株、分離株ともに存在した。また、8 株すべてにおいて一次代謝で生産される細胞壁溶解酵素に関する遺伝子は検出されなかった。一方、二次代謝における抗カビ活性遺伝子は検出され、特に抗カビ活性を強く示した CE4 株および TSASi1 株において多く存在した。抗カビ活性遺伝子として既に報告されている他菌種のクラスターと 100% の相同性を示すクラスターが存在する一方、既知の遺伝子クラスターと相同性を示さない新規な遺伝子クラスターも存在した。

P1-57

東京上空を浮遊する氷核活性微生物の分析化学的解析

○大川 雄輝¹, 牧 輝弥², 三隅 良平³, 宇治 靖³, 真塩 麻彩実², 長谷川 浩²¹金沢大・院自, ²金沢大・理工, ³防災科学研究所

E-mail: yuukikawa0829@gmail.com

【目的】バイオエアロゾルは真菌および細菌、ウイルス、花粉などを含む生物由来の浮遊粒子状物質である。大気中を浮遊する微生物は、ヒトや動植物に感染し、健康被害を及ぼすだけでなく、氷核として働き氷雲を形成し、気候変化に影響を与える可能性がある。従って、人口が密集する大都市東京上空を飛び交う微生物に関する知見は、公衆衛生情報を提供するとともに、都市上空の気象予測にも繋がる。そこで、本研究では、東京スカイツリーに大気観測拠点を設け、東京上空を浮遊する微生物の季節変化を、定性定量的に調べる観測調査を行った。【実験】2018年4月および6月、7月、11月、2019年1月の計5回、東京スカイツリーの観測室（高度458 m）にて、大気粒子を孔径0.2 μmポリカーボネートフィルター上に採取した。採取した大気粒子試料をDAPIで染色し、蛍光顕微鏡観察によって大気粒子密度を求めた。また、試料に含まれる微生物を希釈培養法によって分離培養し、得られた微生物株のITS領域あるいはrRNA遺伝子配列を用いて系統分類学的に同定した。微生物株の氷核活性機能は、小滴凍結実験によって検証した。さらに、大気粒子から抽出したゲノムDNAを使った次世代シーケンシングによって、大気浮遊微生物の群集構造を解析した。【結果・考察】東京上空を浮遊する大気粒子を蛍光顕微鏡で観察したところ、細菌の粒子密度は春から冬にかけて106から104 particles m⁻³に減少し、真菌胞子は春夏に104のオーダーを維持し、秋冬では1/100に低下した。生物活性の高い春と夏には微生物が多く浮遊し、冬季には浮遊数が減少したと考えられる。また、紫外線などが強い春夏では胞子の形態をとり環境ストレスを軽減する真菌類が増えたと推察できる。大気試料から得られた微生物株を小滴凍結実験に使用した結果、鉱物粒子の凍結温度-15℃よりも高い温度で凍結した微生物株が得られ、最も氷核活性が高かった株は-11℃で凍結した。真菌類の群集構造では、Aspergillaceae科の真菌種が、秋に17.6%で優占し、冬も15.1%で維持した。一方、細菌群集に関しては、Gammaproteobacteria網の細菌種が秋に41.7%を占め優占したのに対し、冬ではActinobacteria門の細菌種が優占し、群集構造が季節的に変化した。今回検出された核酸塩基配列は、感染菌とも近縁となった。従って、東京上空には潜在的に健康や気候変化に影響を及ぼす微生物が浮遊している可能性が示唆された。

P1-58

微生物により生成されるメタンの濃度測定へのレーザー吸収分光法の適用

○川野 誠¹, 中山 洋平², 木村 浩之²¹横河電機(株), ²静岡大・理・地球

E-mail: Makoto.Kawano@jp.yokogawa.com

地球温暖化問題が注目されている。COP21で合意されたパリ協定では、温度上昇を産業革命以前に比べて2℃以下に保ち、1.5℃以下に抑える努力をするという目標が掲げられた。その目標を実現するためには、2050年には二酸化炭素排出量をゼロにする必要があり、現在、研究開発が進められている。これまでは、回収した二酸化炭素を地中に埋めるCCS (Carbon dioxide Capture and Storage)、石油の回収を増進するEOR (Enhanced Oil Recovery) が注目されてきたが、近年では、回収した二酸化炭素を炭素資源として活用するCCU (Carbon dioxide Capture and Utilization) の開発が進められている。CCU技術の中に二酸化炭素のメタン化(メタネーション)が挙げられるが、微生物においても、メタン生成菌が二酸化炭素からメタンを生成することが知られている。メタン生成菌の活性を知る方法の一つとしてガス組成分析があり、その分析には一般的にガスクロマトグラフィーが用いられてきた。しかしながら、ガス試料を採取する際に、空気や雑菌が混入する恐れがあり、嫌気性環境下で生育するメタン生成菌にとって環境の悪化を引き起こす原因となり得る。本研究では、非接触かつ短時間での測定が可能である波長可変型レーザー吸収分光法 (Tunable diode laser absorption spectroscopy: TDLAS) のメタンガス測定への適用を検討し、メタン濃度0 ~ 100 vol. %において濃度測定が可能であることを確認した。次に、水素資化性メタン生成菌の菌株及び大深度掘削井から採取した嫌気性地下水に含まれる微生物群集をそれぞれ異なる培地を添加したバイアル瓶に植え付け、ヘッドスペースをH₂/CO₂ (80:20, vol/vol; 250 kPa) で置換して嫌気培養を行った。水素ガスが全て消費され、二酸化炭素のメタン化が完了した後に、再度、バイアル瓶のヘッドスペースをH₂/CO₂に置換し、培養実験を繰り返し行ったところ、培養回数とともにメタン生成速度が増大することを確認した。また、培地の種類、温度、菌株の種類によってメタン化完了に要する時間が異なることが明らかになった。本発表では、メタン生成特性を経時的に追うとともに、培養条件や菌株、地下圏微生物群集による違いについて考察する。

P1-59

海底下堆積物における孢子検出法の確立とその詳細解析

○寺田 武志¹, 諸野 祐樹², 菅 大暉³, 武市 泰男⁴, 若林 大佑⁴, 山下 翔平⁴, 高橋 嘉夫³

¹(株) マリン・ワーク・ジャパン, ²海洋研究開発機構, ³東京大学, ⁴高エネルギー加速器研究機構

E-mail: teradat@mwj.co.jp

【目的】地球表面積の7割を占める海の下に広がる海底下生命圏には、膨大な数の微生物が存在しており、外洋の超貧栄養環境でも微生物細胞が存在していることが分かっている。これら海底下堆積物において、膨大な数の微生物細胞が存在していることがAcridine OrangeやDAPI、SYBR Green Iなどによる検出で示されてきた。一方、通常の細胞（栄養細胞）の数を凌駕する孢子の存在が、内生孢子に多く含まれるジピコリン酸の検出により示唆されていた（Lomstein *et al.*, 2012）が、孢子を直接確認した例は未だ存在しない。本研究では、海底下堆積物において内生孢子を検出し解析することを目的として、純粋菌株ならびに海底下堆積物を用いた染色、特異的分取、そして分子生物学およびX線吸収分光解析を試みた。

【方法】*Bacillus subtilis*、*Bacillus megaterium*等、内生孢子を形成することが知られている純粋菌株を標準試料として用いた。また、海底下堆積物試料としては地球深部探査船「ちきゅう」を用いた表層科学掘削プログラム（SCORE Expedition 910）によって襟裳岬西方沖海底下より得られた掘削試料を用いた。ハイスピードセルソーターによる孢子の選択的分取を行うための細胞染色剤としてオーラミンを用い、内生孢子の選択的染色を実施した。分取により得られた孢子を用いて、16S rRNA 遺伝子配列解析のほか、走査型透過X線顕微鏡（Scanning Transmission X-ray Microscopy: STXM）による分析を実施した。

【結果と考察】分取された内生孢子に対して、アルカリ溶菌法によるDNA抽出を行い、遺伝子増幅を試みたところ、純粋菌株の内生孢子では16S rRNA 遺伝子の増幅が認められた。また、STXMによる分析においては、孢子、および栄養細胞で異なったスペクトルが得られた他、海底下微生物細胞においてもスペクトルを取得した。海底下環境は極度に栄養源が欠乏した環境であることが知られている。このような環境では微生物細胞は外界との物質の移動を制限すると考えられており、その一つの形態である孢子を直接解析することは、海底下生命とその生存戦略を理解することに繋がると考えられる。

P1-60

大腸菌のコエンザイムA増産株を用いたポリヒドロキシ酪酸生産

○小野 渉¹, 阿部 健太², 朝山 宗彦^{1,2}, 西原 宏史^{1,2}, 長南 茂^{1,2}

¹茨城大・院農, ²茨城大・農

【目的】コエンザイムA (CoA) は生体内でアシル基のキャリアとして機能する補酵素で、5段階の酵素反応で生合成される。初発反応を触媒するパントテン酸キナーゼ (CoaA) が本生合成経路の鍵酵素となっており、これまでに*Pseudomonas putida*由来*coaA*を用いることにより、大腸菌 (*Escherichia coli*) の細胞内アセチル-CoA レベルを上げることに成功している。そこで、本要素技術の物質生産への応用を検討した。具体的には、*Microcystis aeruginosa*由来ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 生合成遺伝子 (*pha*) を形質転換した*E. coli*のCoA増産株を用いて、アセチル-CoAから生合成されるPHBの生産量を解析した。

【方法】*P. putida*由来 *coaA* および *M. aeruginosa*由来 *phaABEC* をPCRで増幅し、pSTV28、pUC118、あるいはpQE-60にクローニングし、発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドを*E. coli* JM109に形質転換し、5 mM パントテン酸を含むM9培地で振とう培養した。菌体を回収し、アセトン菌体を調製後、クロロホルムに懸濁し、3% 硫酸-メタノール溶液中でメタノリシス処理後、生じた3-ヒドロキシ酪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。

【結果および考察】*coaA* を pSTV28 に持つ pSTV-Pp-*coaA* および *phaABEC* を pUC118 に持つ pUC-Ma-*phaABEC* の形質転換体では、*coaA* を持たない対照株のおよそ3倍のPHB生産が観察され、*coaA* の有効性が確認された。しかし、生産量が1%(w/w)未満と低かったため、次に *phaABEC* を pQE-60 の T5 プロモーターの下流に連結した pQE-Ma-*phaABEC* を使って検討した。IPTG 添加の有無にかかわらず、*coaA* を保持する形質転換体で、より高いPHB生産が見られた。また、IPTG を添加しない方が形質転換体の生育が良かったため、生産量は高い結果となった。30°C培養では、*coaA* の有無で生産量がおよそ2倍異なり、IPTG 無添加条件下の pQE-Ma-*phaABEC* と共に pSTV-Pp-*coaA* を保持する形質転換体で最も高い7.27%(w/w) のPHB生産が観察された。以上の結果より、*coaA* によるアセチル-CoA 供給の強化はPHB生産に有効であることが示された。

P1-61

ブタンジオール生産能に関わる *Serratia marcescens* 由来ニコチンアミダーゼの X線結晶構造解析

○大山 拓次, 大槻 隆司

山梨大院・生命環境

セラチア菌は「霊菌」とも呼ばれ、日和見感染の原因としてネガティブなイメージを持たれるが、健康な人に対しては無毒であるばかりでなく、そもそも主要な常在菌の一つである。また、土壌、大気中、水中など環境にも幅広く存在しているグラム陰性桿菌である。さらに、ブタンジオール生産能を持つなどユニークな代謝システムを有していることから、バイオ産業に有用な酵素群を持つ生物として着目を浴びている。我々はこれまで、化学産業において医薬品や化粧品の基幹化合物であるブタンジエン、ブタンジオールに関して、将来の化石資源の枯渇問題を熟慮し、現在の化石燃料に依存した供給システムから微生物発酵による代替供給システムへの転換を実現するための、微生物スクリーニング、および目的化合物生産に関わる酵素群の同定と工業生産に向けた酵素改良工学を行ってきた。ごく近年、*Serratia marcescens* NBRC3735 株がグルコースを炭素源として 2,3-ブタンジオール (2,3-BD) を高生産することを見出し、変異導入、代謝マップ解析等から、ニコチンアミダーゼがブタンジオールの生産量に深く関わることを突き止めた (大槻ら 日本農芸化学会年会 2015; 張、大槻 日本生物工学会年会 2016)。今後のより高いブタンジオール生産能を持つ改良株の獲得を見据え、ニコチンアミダーゼ (以下本酵素) に関する構造機能相関を理解するため、本酵素の結晶構造解析に着手した。本酵素遺伝子を上記株よりクローニングし、大腸菌発現系を用い、アフィニティタグ融合体として組換えタンパク質を大量発現した。アフィニティークロマトグラフィーにより迅速かつ高純度の本酵素を精製し、結晶化条件を検索し、高分解能構造決定可能な単結晶を得た。シンクロトロン放射光施設 (つくばフォトンファクトリー) にて 1.4 Å 分解能の X線回折データの収集に成功し、アミノ酸配列 90% 同一の構造既知タンパク質をプローブとした分子置換法により基本構造を決定した。本酵素は総質量 184K のホモ 8 量体を形成していることが明らかとなった。講演では本酵素の構造機能相関についてより詳細に議論する。

P1-62

脂肪酸生産におけるマロニル-CoA 供給系強化の有効性

○加来 萌菜¹, 佐藤 州朔¹, 石平 芽衣², 朝山 宗彦^{1,2}, 長南 茂^{1,2}¹茨城大・院農, ²茨城大・農

【目的】コエンザイム A (CoA) はアシル基のキャリアとして機能する補酵素で、細胞内ではアセチル-CoA、マロニル-CoA、および CoA が主要な CoA 分子種となっている。当研究室では、CoA 生合成経路の鍵酵素であるパントテン酸キナーゼ (CoaA) 遺伝子とアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) 遺伝子を組み合わせることによって、大腸菌 (*Escherichia coli*) でマロニル-CoA の増産に成功した。また、細胞内マロニル-CoA レベルの上昇は脂肪酸増産につながり、さらに外来の脂肪酸合成酵素 (FasA) 遺伝子の追加で脂肪酸生成がおよそ 6 倍になった。これらは培養初期に生育の遅れが観察される IPTG 存在下で得られた結果であるが、今回は生育阻害が解消される IPTG 非存在下での脂肪酸生産を報告する。

【方法】*Pseudomonas putida* 由来 CoaA 遺伝子および *Corynebacterium glutamicum* 由来 Acc 遺伝子を pSTV28 に持つマロニル-CoA 増産用プラスミド、*C. glutamicum* 由来 FasA 遺伝子を pQE-60 の T5 プロモーターの下流に持つ脂肪酸生産用プラスミドを組み合わせて *E. coli* JM109 に形質転換し、5 mM パントテン酸および 2% グルコースを含む M9 培地を用いて、IPTG 非存在下で 72 時間振とう培養した。菌体から脂質を抽出し、メタノリシス処理後、GC-FID で脂肪酸メチルを測定した。

【結果および考察】37°C で培養した形質転換体の脂肪酸含量を解析した結果、Acc 単独発現株では対象株の 2.1 倍、Acc と CoaA の共発現株で 6.7 倍の 609 mg/L となった。Acc の効果は IPTG 存在下での結果とよく一致していたが、CoaA の効果は大きく、Acc と CoaA だけで脂肪酸生産量を上げるには十分であることが示された。次に、30°C で解析した結果、Acc 単独発現株で 7.0 倍、Acc と CoaA の共発現株で 8.4 倍の 778 mg/L に増大した。また、FasA に起因するオレイン酸の生産は 37°C ではほとんど観察されなかったが、30°C では IPTG 非存在下にもかかわらず、Acc と FasA の共発現株および前記株に CoaA を加えた共発現株ではそれぞれ総脂肪酸の 16% および 18% を占めた。以上のことから IPTG による FasA の発現誘導がなくても、Acc と CoaA によるマロニル-CoA 供給系の強化だけで脂肪酸生産量を十分に大きくできること、また 30°C 培養では FasA が機能していることが分かった。

P1-63

モンゴル国土壌および動物乾燥フン中の細菌系統解析と好熱性細菌の探索

○佐藤 高則^{1,4}, 岡部 康平², 木村 柚香¹, 三谷 峻馬¹, 林 太功磨¹, Ganbat Orgilbayar³, Logii Narantsetseg³, Janlav Munkhtsetseg³, 秋吉 研二⁴

¹徳島大・理工・生化, ²岡部農園, ³モンゴル国立医科大学, ⁴徳島大院・総科・生化

E-mail: tsatoh@tokushima-u.ac.jp

過去の研究において我々は、四国や和歌山の銅鉱山跡や石灰鉱山の採掘滓、国内外で生産される発酵食品中などの微生物相の特徴について、クローンライブラリー法および細菌の単離同定による検討を行ってきた。その中で、震災前の福島県畜産農家で生産された堆肥より好熱性細菌を探索し、単離・同定を行ったところ、*Geobacillus*属および*Anoxybacillus*属細菌であることが明らかとなった。このような自然環境や発酵食文化を微生物資源としてとらえ、微生物相に関する知見を得ることは、未利用微生物資源の有効利用に重要であると考えられる。そこで本研究では、モンゴル国遊牧民が燃料などに利用している乾燥動物フン(ウシ:アルガル(AG)、ウマ:ホモール(KM)、ヒツジ:ホルゴル(KG))、およびその周辺土壌(MS)に着目し、それらに含まれる微生物相の特徴をクローンライブラリー法により検討した。さらにこれらの乾燥動物フンAGより好熱性細菌の探索を行った。

まず、モンゴル国で採取した各動物フン(AG, KM, KG)およびこれらの周辺土壌(MS)の滅菌水洗浄液からゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型として16SrRNA遺伝子のPCRを行ったところ、各試料において約1.5kbpの増幅断片が確認された。これらをpGEM-Tにクローニングし、得られたクローンをそれぞれDNA塩基配列決定および相同性解析を行った。その結果、AGでは*Methylobacterium*属細菌が優占種であり、一方KMでは*Acinetobacter*属細菌が、KGでは*Pedobacter*属 および *Devosia*属細菌などが検出された。一方MSでは、*Flavisolibacter*属や*Aquicola*属細菌などが見られた。

上記のクローンライブラリーでは好熱性細菌は検出されなかったが、好熱性細菌が存在する可能性を検討するためAG洗浄液を65℃で培養したところ、細菌の増殖が見られた。この培養液より23種の好熱性細菌の単離(AGI)を行い、各ゲノムDNAを調製した。これらを鋳型としてPCRにより16S rRNA遺伝子を増幅し、pGEM-Tに挿入後、塩基配列解析により細菌の同定を行った。その結果、解析した18種はいずれも*Thermoactinomyces vulgaris*と高い相同性(98.7-100%)を示し、AGにおける好熱性細菌としては*Thermoactinomyces*属細菌が優占種であることが示唆された。現在、モンゴル土壌や他の乾燥動物フン由来好熱性細菌の単離同定も行っている。

P1-64

Gluconobacter frateurii NBRC 103465 株のメタノール耐性変異株の解析

○新井 裕也¹, 佐藤 俊², 小池 英明³, 薬師 寿治⁴, 松下一信⁴, 布施 博之¹, 羽部 浩⁵

¹芝工大・応用生, ²産総研・機能化学, ³産総研・生物プロセス, ⁴山口大・農, ⁵産総研・環境管理

E-mail: mf18003@shibaura-it.ac.jp

[目的]オレオケミカル産業等において副生するグリセリンの有効活用が課題となっている。副生グリセリンにはグリセリン以外にも、メタノールや脂肪酸等の目的外物質が多く含まれるため、触媒を用いた化学合成の原料とするためには精製が必要となり、エネルギーやコストがかかる。一方、微生物を用いた化学品合成の原料とする場合には、酵素の基質特異性の高さから反応に対する不純物の影響は少なく、副生グリセリンの精製度が低い場合でも化学品原料としての利用が期待される。しかし、目的外物質であるメタノールは、グリセリンをD-グリセリン酸へと高効率で変換可能な酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 株の生育を阻害する物質であり、実際にメタノール5 vol%の存在下では増殖できない。そのため化学変異によってメタノール耐性を有するNBRC103465株の変異株であるGf398株を取得・解析したところ、10 vol%メタノール存在下においても生育することが確認された。そこで本研究では、Gf398株のメタノール耐性機構を分子レベルで解析することを目的とした。[方法と結果]G. frateurii親株NBRC103465と変異株Gf398について次世代シーケンサーを用いた比較ゲノム解析を行うことで遺伝子変異箇所の特定制を行った。その結果、構造遺伝子内部やプロモーター領域に点変異が確認された遺伝子が少なくとも30個確認された。これら遺伝子の内訳は、物質代謝に関与すると推測される遺伝子が6、核酸の複製や修復に関与すると推測される遺伝子が6、推定膜タンパク質をコードする遺伝子が4、転写調節因子をコードする遺伝子が2、hypothetical proteinと相同性を示す遺伝子が12であった。2種類の転写調節因子に着目すると、1つは多剤耐性転写因子としても知られるPadRファミリーに属する転写調節因子であり、Gf398株において、構造遺伝子ではなくプロモーター領域に1ヶ所の点変異が確認されたことから、NBRC103465株とGf398株では本転写調節遺伝子の発現量に差が見られる可能性が考えられた。また、もうひとつの転写調節因子は、浸透圧や有機酸耐性等に関与するOmpRファミリーに属する転写調節因子であり、Gf398株において、構造遺伝子内に1ヶ所の点変異が確認されていることを確認した。これらpadRおよびompRホモログをコードする遺伝子を広宿主域ベクターpBBR1MCS-4に連結し、三親接合法によりNBRC103465株やGf398株に導入することで形質転換株を作製した。

P1-65

Genomic and functional characteristics of an aerobic anoxygenic phototroph isolated from an enrichment culture containing aromatic hydrocarbons

○Kyoko Kubo¹, Namiko Gibu², Daisuke Kasai²

¹Dept. Creative Engineering, NIT, Tsuruoka College, ²Dept. Bioengineering, Nagaoka University of Technology

Aerobic anoxygenic phototrophs (AAnPs) distribute widely in marine and freshwater environments. They are recognized as key players in carbon cycle because of their ability to use various organic substances as carbon sources. An AAnP, *Roseibacterium* sp. strain 2-3-A2 was isolated from an anoxic enrichment culture from sandy sediment of a coastal intertidal beach in Okinawa, Japan. Toluene was added to the enrichment culture as a carbon source. In this study, we obtained a draft genome sequence of the newly isolated strain and analyzed its functional characteristics. The strain is heterotroph as it lacks the RubisCO coding genes of the Calvin cycle. A complete photosynthesis gene cluster was detected. Genome sequence and in vivo absorption spectrum show that the strain possess light-harvesting system LH1 and LH2. Strain 2-3-A2 grow aerobically, and light enhance the growth. In addition, preliminary results of cultivation experiments indicate that strain 2-3-A2 can grow photosynthetically under microoxic and anoxic conditions. It is contrary to most other AAnPs which can carry out photosynthesis only in the presence of oxygen. A gene encoding a homolog of the phenol 2-monoxygenase was detected. This enzyme catalyzes the first step of the degradation of phenol, and could participate in toluene degradation. AAnPs are so far unknown to be involved in aromatic hydrocarbon degradation. These unique genetic makeup and physiological characteristics provide hints for understanding the ecological role of AAnPs in the aquatic environment.

P1-66

アンモニア酸化古細菌で広範囲に保存され、 高発現している銅含有型亜硝酸還元酵素 (NirK) の役割はなにか？

○押木 守¹, 小林 駿¹, 平 大輔², 吉田 圭太郎³, 豊福 雅典³, 志田 洋介⁴, 小笠原 渉⁴, 山口 隆司⁵, 荒木 信夫⁵

¹Dept. Civil. Eng. Nat. Inst. Technol. Nagaoka Coll., ²Dept. Appl. Life Sci., Sojyo Univ., ³Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ⁴Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Technol., ⁵Dept. Sci. Technol. Innov., Nagaoka Univ. Technol.

E-mail: oshiki@nagaoka-ct.ac.jp

好気性アンモニア酸化反応 ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$) は年間 100-2000 メガトンのアンモニアを酸化しており、地球上の窒素循環において、大動脈と言える反応である。好気性アンモニア酸化反応はアンモニア酸化細菌 (AOB) によって担われていると長らく考えられてきたが、2000 年代中頃にアンモニア酸化古細菌 (AOA) の存在が発見され、AOA が海洋や土壌といった幅広い自然環境に分布し、アンモニア酸化反応に大きく関与していることが明らかになっている。AOA のアンモニア酸化反応において、一酸化窒素 (NO) を選択的に除去すると、AOA がアンモニア酸化活性を失うことが明らかとなっている。このことから AOA のアンモニア酸化反応において NO は必須の中間代謝物と考えられているが、AOA が NO を生成する機構は解明されていない。NO₂⁻ を NO まで還元する銅含有型亜硝酸還元酵素 (NirK) は脱窒菌で広く知られている酵素であるが、AOA のゲノム解析から AOA が nirK を共通して保有していることが明らかとなっている。AOA による NO の生成において NirK が関与していることが示唆されているものの、AOA の NirK が NO₂⁻ を還元し、NO を生成することは未だ実証されていない。本研究では、土壌性アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* の保有する NirK について、大腸菌を用いた異種発現を行い、NirK の酵素学的な特性を明らかにすることを旨とした。本研究で得られた *Ns. viennensis* NirK について物性を調査したところ、105 kDa の分子量を持つホモ三量体構造を有し、アミノ酸配列から推定された通り type 1 および 2 銅結合サイトを保有していた。NirK は亜硝酸還元活性を有し、15NO₂⁻ を 15NO に還元した。また、興味深い現象として、*Ns. viennensis* NirK はオキシダーゼ活性を有し、15NH₂OH を 15NO に酸化すること、NO₂⁻ と NH₂OH から N₂O を生成する反応を触媒することを我々は明らかにした。本研究は AOA の生化学を触媒酵素のレベルで解析した世界初の報告であり、従来予想されていた NO の生成反応以外にも NirK が AOA の代謝反応に寄与していることを明らかにした。

P1-67

Roseateles depolymerans の光利用**— 光合成器官形成不能ミュータントの生残能力**○陶山 哲志¹, 菅野 菜々子², 花田 智², 千原 康太郎^{1,3}, 松倉 智子¹, 野田 尚宏^{1,3}¹産総研・バイオメディカル, ²首都大・院・理, ³早稲田大学・理工学術院

E-mail: t.suyama@aist.go.jp

【目的】 飢餓に陥ったとき、多くの細菌は代謝を切り換えサバイバルに有利な状態に移行する。増殖速度の低下、休眠、利用基質の変更、変異出現率の増加、毒素生産など、その方法は様々である。紅色光合成細菌の一種である *Roseateles depolymerans* はエネルギー源として利用できる有機物が欠乏した状況でのみ光合成器官を形成するという特異な性質を持っている。我々はかつて野生株の *R. depolymerans* を明・暗条件の炭素源飢餓状態で長期間培養することにより「栄養増殖ではなく飢餓状態を生き延びる手段として光合成器官を持っている可能性が高い」という結論を得た。最近になって *R. depolymerans* の転写調節系の遺伝子破壊株に光合成器官形成能が著しく低下した株 (1AA1・1AB1) を見出した。あらためて *R. depolymerans* の光合成器官が生残に寄与している可能性について吟味したのでこれを報告する。

【方法】 遺伝子破壊株の光合成器官形成不全に関しては、光合成色素の吸収スペクトルで判定したほか、1AA1 株に関しては 6 時間飢餓培養後の全 RNA 配列のリード数を解析し、野生株の結果と比較した。また生残に関しては 0.4% コハク酸を含む培地で対数増殖中期まで培養した菌体を回収、炭素源フリーの培地に移し白熱電球の光照射下で長期間の振盪培養を行い、コロニー形成の有無から生残数の判定を行った。

【結果】 1AA1 株は野生株に比べて光合成反応中心複合体のアポ蛋白質をコードする *pufL, M, C* と *pufA* 遺伝子および色素生合成系の酵素群をコードする *bch* オペロンに含まれる遺伝子の転写産物量比 (TPM) が 1/5 以下にまで減少していた。光捕集蛋白複合体のアポ蛋白質をコードする *pufB, A* 遺伝子の転写産物にいたっては TPM が野生株の 1% 以下にまで減少していた。遺伝子破壊の影響を受けたのはこれら光合成関連遺伝子がほとんどであったが、一部緊縮応答に係る遺伝子やトキシン・アンチトキシンの遺伝子転写産物量にも変化が見られた。また、光照射下で生残数の維持を比較したところ、3 週目で 1AA1・1AB1 株の生残数は野生株より一桁低いレベルにまで低下した。また破壊した遺伝子を補完した株では野生株と同等の生残数に回復したことから、*R. depolymerans* の光合成器官の生残能への寄与が確認された。今後は光合成関連遺伝子と同じ転写調節を受けると推定される他の遺伝子やその調節系に着目して *R. depolymerans* の緊縮応答システムの全貌を明らかにしたい。

P1-68

生理活性をもつ磁硫化鉄が嫌気性微生物群集へ与える影響の解析

○五十嵐 健輔

産総研・生物プロセス

E-mail: igarashi.kensuke@aist.go.jp

【背景と目的】 環境中の多くの微生物は、鉱物と相互作用しながら生存している。硫化鉄は様々な嫌気環境に豊富に見られる鉱物であり、電子供与体や微生物間電子伝達の媒介物質として研究されてきた。発表者のこれまでの研究により、磁硫化鉄の一種であるグライグイト (Fe_3S_4) は様々なメタン菌の増殖と代謝を促進する生理活性をもつことが明らかになった。しかし、この生理活性について微生物群集を対象とした研究はなされていない。そこで本研究では、グライグイトが嫌気性微生物群集へ与える影響を、増殖と代謝、および菌叢の観点から明らかにすることを目的とした。【方法】 水田の嫌気土壌を微生物源として、グライグイト添加/非添加の独立栄養性培地 (基質: H_2+CO_2 または CO) を用い、嫌気的な集積培養を行った。菌密度および代謝産物の経時的な測定によって増殖と代謝速度の定量化を行った。集積培養物から DNA を抽出し次世代シーケンサーによる網羅的菌叢解析を行った。【結果と考察】 グライグイト存在下では非存在下に比べ、増殖とメタンおよび酢酸生産速度の著しい上昇がみられた。このような増殖と代謝の促進は、他の硫化鉄種、酸化鉄種では見られず、グライグイト依存的な代謝の変化が示唆された。この促進傾向は単離菌を用いた先行研究での結果と一致しており、グライグイト依存的な代謝の変化は群集でも共通して起こることが示唆された。グライグイト存在下での継代培養では、増殖と代謝の促進を維持しつつ、徐々にメタン生産より酢酸生産が優性となった。菌叢解析の結果、特にグライグイト存在下の集積培養で、メタン菌よりも酢酸生成菌が優占したことに加え、近縁種と比較的低い相同性 (94%) を示す *Bacteroides* 属の細菌も集積されていることが明らかになった。グライグイトは、その結晶構造中に生物がもつ鉄イオウクラスターに類似した構造を有しているため、初期生命は環境中のグライグイトなどから鉄イオウクラスターを調達していたと推定されている。更に最近、植物寄生性細菌において細胞外の鉄イオウクラスターを直接取込むトランスポーターの存在が報告されており、微生物と細胞外の鉄イオウクラスターやその類似鉱物との関係性は注目されているトピックである。本研究は、環境微生物と硫化鉄との相互作用へ新たな知見を提供するとともに、細胞外鉄イオウクラスター依存的な増殖を示す新規微生物の取得の足がかりになると期待される。

P1-69

ポリスチレンビーズを用いた海産原生生物の餌粒子サイズによる捕食選好性

石田 香澄, ○片岡 剛文

福井県大・海洋

水圏環境の食物網においては、ナノサイズ (2-20 μm) の従属栄養の鞭毛虫や、繊毛虫などの原生生物が、主な細菌捕食者として知られており、微生物ループにおいて重要なニッチを占めている。原生生物がどのような餌を好むか (餌選好性) については、濾過摂食や捕獲接触といった原生生物の捕食形態や、餌となる細菌の細胞サイズ・生死・細胞表面の化学的特性・生理状態など、多くの要因が挙げられる。海洋を含む水圏環境で優占する浮遊性細菌の細胞サイズは細胞長径が0.2-2.0 μm であるが、原生生物の存在下で、糸状や螺旋状へ形態を変化することで巨大化したり、逆に小型化したりする応答が知られている。このような細菌は細胞サイズを変化させることで原生生物による捕食を回避していると考えられている。一方、細菌捕食性の原生生物は自身の細胞サイズに依存して異なるサイズの餌細菌を選択している報告がある。つまり、餌となる細菌の細胞サイズは原生生物の捕食と関係があると考えられる。本研究では、最適な実験方法を確立したうえで、日向湖 (海水) と水月湖 (汽水湖) から新たに単離された3種類の従属栄養性原生生物を用いて、粒子径が異なる蛍光ビーズを用いて蛍光トレーサー法により、餌サイズに対する捕食選好性の検証と細菌摂食速度を比較した。海水湖である日向湖由来の原生生物2株 (Amoebozoa と Stramenopiles) と汽水湖である水月湖由来の原生生物1株 (Excavata) を、酵母エキスを有機物源 (最終濃度 25 ppm w/v) とした人工海水中培養した。対数増殖期の原生生物を遠心分離により濃縮し、培養液中の細菌密度の約 10% になるように蛍光ビーズを希釈した。蛍光ビーズは粒子直径が、0.1, 0.5, 1.0 μm の3種類を使用した。濃縮した原生生物とビーズを混合し、室温で 15 分間培養した後、0 分および 15 分後に 1 mL を採集し、冷却した等量の Tris-buffered グルタルアルデヒド (4%, pH=8) で素早く固定した (最終濃度 2%)。DAPI で染色した原生生物を蛍光顕微鏡下で 100 細胞観察し、蛍光ビーズの取り込みを計測した。原生生物 1 細胞あたりの細菌摂食速度を算出した結果、0.1 μm の蛍光ビーズはいずれの株も摂食が確認されなかった。0.5 μm と 1.0 μm のビーズではそれぞれ摂食が確認されたが、どの生物も 0.5 μm を最も多く摂食しており、0.5 μm のビーズが原生生物にとって最適な餌サイズであることが明らかとなった。

P1-70

窒素固定遺伝子を有する脱窒細菌による N_2O 固定の検証

鈴木 里俊¹, 早川 智恵^{1,2}, 増田 曜子¹, 西澤 智康³, 菅原 雅之⁴, 嵐田 遥⁴, 南澤 究⁴, 磯部 一夫¹, ○妹尾 啓史^{1,5}

¹東大院農, ²宇大農, ³茨大農, ⁴東北大院生命, ⁵東大微生物連携機構

背景と目的: 水田土壌において、脱窒は系外に窒素を損失する反応過程であると見なされてきた。当研究室において、脱窒細菌として分離した *Bradyrhizobium* 属などの細菌が窒素固定遺伝子を有し窒素固定能を示すことを見出した。また、これまでの研究から、*nif* 遺伝子、*nosZ* 遺伝子を保有する水田土壌中の脱窒細菌が Nos により N_2O を N_2 へと変換し、Nif によって N_2 を同化的に還元する可能性が考えられた。しかし、(1) *nif* 遺伝子を保有する水田土壌由来の脱窒細菌による N_2O 還元・同化の有無、(2) 菌体への N_2O 由来の窒素の同化量、(3) 具体的な反応経路については不明である。本研究では、上記の仮説を検証するため、水田土壌から単離された脱窒菌を用いて (1)、(2) を調べると共に、遺伝子破壊株を用いて (3) を解明することを目的とした。今回は (1)、(2) について報告する。

材料と方法: 水田土壌より単離された窒素固定遺伝子を有する脱窒細菌 *Bradyrhizobium* sp. UNPF46 株を用いた。菌体を接種した培養液に $^{15}\text{N}_2\text{O}$ (99 atom%) を添加・密閉して静置培養し、気相中の $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 濃度、 $^{15}\text{N}_2$ 濃度を経時的に GC-MS で測定した。培養後の菌体を遠心洗浄・集菌し、菌体の窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を IR-MS、窒素濃度を NC アナライザーで測定した。同じ条件で培養した菌体懸濁液から RNA を抽出し、定量 PCR によって *nosZ* 遺伝子と *nifD* 遺伝子の転写量を測定した。

結果と考察: 培養 4 日間で添加した $^{15}\text{N}_2\text{O}$ の約 75 % が減少し、そのうちの約 24 % が $^{15}\text{N}_2$ に変換された。培養後の菌体の $\delta^{15}\text{N}$ は、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 添加前の菌体 (1.8‰) と比較して有意な増加が認められ (394.6‰)、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 由来の窒素が脱窒細菌の菌体に同化されたことが定量的に示された。一方、同じ条件で培養した菌体において *nifD*、*nosZ* の転写が確認できた。これらは UNPF46 株によって N_2O が還元・同化されたことを支持する結果であると考えられた。

P1-71

土壤に存在する γ -プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌の分布と多様性

○早津 雅仁¹, 王 勇¹, 大久保 卓², 廣野 祐平³, 宇田川 真由美¹, 多胡 香奈子¹

¹農研機構・農環研, ²JAMSTEC, ³農研機構・果樹茶研究部門

E-mail: hayatsu@affrc.go.jp

土壤の硝化(アンモニア酸化)はアンモニア酸化細菌(AOB)、アンモニア酸化古細菌(AOA)、完全硝化菌(Comammox)に担われている。農耕地のように窒素肥料の施用によりアンモニア性窒素の濃度が高くなる環境ではAOBが重要と考えられている。一方、これまで土壤に存在するAOBは β -プロテオバクテリアに属する(β -AOB)、*Nitrosomonas*属と*Nitrosospira*属とされてきた。しかし我々は強酸性茶園土壤から γ -プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌(γ -AOB)を分離し*Candidatus Nitrosoglobus terrae* TAO100と命名した。本発表では*Nitrosoglobus*属の土壤部位別分布および国内の各地域での分布および新たに分離した γ -AOBについて検討した結果を発表する。(1) TAO100株を検出するためにアンモニアモノオキシゲナーゼサブユニットA(*amoA*)のPCRプライマーを設計し、茶園土壤の深度別分布を調べたところ、土壤表層における菌密度が高い傾向が認められた。そこで各地の土壤表層のTAO-*amoA*の分布を調査することとした。(2) TAO株類似の*amoA*断片は京都府、滋賀県の茶園にも検出された。そこで集積培養による分離を試みたところ、90%以上を γ -AOBが占める培養液を得た。この菌株とTAO100株の16S rDNA塩基配列(1.4kb)の相同性は99%であった。このうち京都から分離した菌株のドラフトゲノム配列を解析したところ、主要な遺伝子はTAO株と極めて相同性が高かった。(3) 鹿児島県の茶園土壤にはTAO-*amoA*が検出されなかったため集積培養を行い得られた微生物群集から遠心分離等により γ -AOBを得た。この菌株のドラフトゲノム配列を解析したところ、ゲノムサイズが2.8MbpとTAO株の2.0Mbpより大きく、16S rDNAおよび*amoA*の解析から*Nitrosoglobus*属と海洋・塩湖由来の*Nitrosococcus*属の中間に位置づけられた。以上により γ -プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌は国内に分布し、その多様性は大きい可能性が示唆された。

P1-72

土壤細菌叢の初期形成過程における移動性細菌の役割

○加藤 広海, 津田 雅孝, 永田 裕二

東北大・院生命

E-mail: katee@ige.tohoku.ac.jp

【背景と目的】土壤に棲息する多様な微生物間において形成される複雑なネットワークによって、自然環境変動下でも安定して土壤機能を発揮できると理解されている。また一方で土壤微生物叢が示す安定性は、土壤改良やバイオオーギュメンテーション等、人間が望んだ菌叢へと変化させる技術に対しては大きな障壁となっている。土壤機能を有効かつ持続的に活用するためには、土壤微生物叢が土壤の物理化学的性質とどのような因果関係にあるか、微生物叢の構造を任意に変化させるために必要な要素は何なのか、を解明する必要がある。そこで本研究では土質の異なる2種類の土壤(褐色森林土と黒ボク土)において微生物移植実験を行なうことで、菌叢形成プロセスへの物理化学的/生物学的因子を定量的に評価することを目的とした。【方法】褐色森林土と黒ボク土を10%ずつ段階的に混合することで、両土壤を連続的に繋ぐ人工土壤を創出した。それぞれの滅菌混合土壤に褐色森林土または黒ボク土から回収した微生物集団を移植し、一定培養条件下で半年間培養した。経時的に土壤サンプルを回収し、培養依存的・非依存的解析に供した。【結果と考察】移植する微生物集団には依らず、黒ボク土の含有率が高いサンプルほど高い菌密度を示し、放線菌の占める割合が高くなる傾向が見られた。このことは、細菌叢形成における菌密度や構造に対して生物学的因子よりも物理化学的因子の方がより強い影響を与えることを示している。さらに黒ボク土の滅菌土壤に移植された微生物集団は長期間経過しても、元の細菌叢構造を再構成できていないことが明らかとなり、黒ボク土細菌叢の復元には何らかの要素が必要である可能性が示された。元の細菌叢を再構成できる褐色森林土では、swarmingやglidingといった移動性の高い分類群が移植直後に優占しており、移動性細菌がその後の細菌叢形成を促している可能性が疑われた。そこでswarming活性のある細菌株を分離した結果、周囲の非移動性細菌を自身のswarmingに同調させて移動できるco-swarming活性が認められた。さらに一部のswarming細菌は土壤において他細菌株の生育を促進する効果があることがわかり、これら細菌群が土壤菌叢形成において重要である可能性が示された。

P1-73

抗菌剤による種イモ消毒がジャガイモ表面の微生物に及ぼす影響

○木嶋 伸行¹, 本城 賢一², 石井 孝昭³

¹農研機構 野菜花き研究部門, ²九大農学研究院, ³合同会社 アグアイッシュ

E-mail: nkijima@affrc.go.jp

ペニシリンの発見以来、抗菌剤は様々な感染症から人類を助けてきた。その一方で、抗菌剤に対する耐性菌が出現し、医療現場における抗菌剤による治療効果の低下が大きな問題となっている。WHOは世界規模での取り組みを呼びかけ、日本政府も2016年に国家行動計画を打ち出し、省庁横断的な取り組みを行っている。我々は農林水産省の委託プロジェクトを通じ、農業生産環境に農薬として投入される抗菌剤のうち、ヒトへの適用例があるオキシテトラサイクリンとストレプトマイシンを対象に、農業生産環境中の微生物に及ぼす影響を調べている。本大会では、ジャガイモの栽培で慣行的に行われるオキシテトラサイクリンとストレプトマイシンによる種イモの消毒処理がジャガイモ表面の細菌に及ぼす影響について報告する。種イモ用のジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.、トヨシロ) を、オキシテトラサイクリン (0.028 %) およびストレプトマイシン (0.19 %) を含む薬液に慣行の手順で数秒間浸漬し、風乾後採取した。採取した種イモを滅菌蒸留水中で攪拌後、水相をPBS (pH 7.4) で適宜希釈しR2Aに塗布し、37°Cで48時間培養し出現したコロニーから任意に細菌を分離した。また、分離した細菌の16S ribosomal RNAの配列を決定し、系統樹を作成した。オキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンによる消毒処理をした種イモと無処理の種イモの表目からはそれぞれ4 Log CFU/g程度のコロニーがR2A上に出現し、両者に差異は認められなかった。一方、16S ribosomal RNAの配列から作成した系統樹では無処理のジャガイモ表面には様々な細菌が存在していたが、消毒処理をしたジャガイモから分離した細菌は一部のクラスターにのみ存在した。この結果から、慣行的なオキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンによる種イモ消毒処理では様々な細菌群に影響を及ぼすが、生き残った細菌群は消毒処理によって生じた生物的空間を埋めることで、消毒処理にかかわらず一定の数を保持したと考えられる。

P1-74

西之島新鮮噴火堆積物の微生物生態系の解析

○藤村 玲子¹, 吉武 和敏¹, 平野 明則², 海老原 諒子², 妹尾 啓史¹, 森 英章³, 川上 和人⁴, 上條 隆志⁵

¹東京大・院農, ²茨城大・農, ³JWRC, ⁴森林総研, ⁵筑波大・生命環境

E-mail: afujimur@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

西之島は小笠原諸島の西に位置する火山島である。2013年から続いた噴火では、溶岩流の流出や火山噴出物の堆積が進み、島の陸地面積は噴火以前の約9倍となった。新たに出現した陸地は陸上生態系形成のプロセスを調査する機会を提供する。本発表では、西之島生態系遷移の調査の一環として、新鮮噴火堆積物の微生物生態系を解析した結果を報告する。

試料のスコリア堆積物は2016年に採取された。低栄養培地での細菌数は 10^6 cells g⁻¹、無窒素培地での細菌数は 10^5 cells g⁻¹を示した。堆積物の呼吸活性は弱いが出検され、微生物活性が示唆された。堆積物の全炭素含量は0.1 mg g⁻¹以下(検出限界)であった一方で、無機態窒素量(特に硝酸)は一般の土壌あるいはそれ以上存在していた。メタゲノム情報から得た微生物群集組成には、大気塵由来と示唆される *Terrabacteria* グループや、海洋由来と示唆される細菌群等が含まれていた。発表では堆積物の窒素含量が高い要因や微生物機能に関する調査結果等を紹介する。

P1-75

土壌微生物の呼吸活性と水稲収量の関連性

○橋本 好弘¹, 森 静香², 藤井 弘志²

¹無所属, ²山形大学 農

E-mail: y-hashimoto@kd6.so-net.ne.jp

【目的】水稲の作物収量においては、特に土壌の地力が重要とされている。しかし、地力の簡単・迅速・安価な評価方法は未確立である。そこで、著者らは、土壌の生物性診断装置として開発したバイオセンサー¹⁾を用いて、土壌微生物の呼吸活性を測定し、水稲収量との関係を調査した。【方法】山形県庄内地区の現地圃場を選定した。水稲収量は、JAの営農指導員および生産者の協力の元、圃場の全刈収量より算出した。各圃場3か所ずつ、表土を薄く除き、上層(0-5 cm)、下層(5-10 cm)を採取(2017年11月14-15日および、2018年10月16-17日)。生土50gを250mlの水によく懸濁し、Flush処理で土壌粒子を除去後、遠心分離(8,060xg、15分)により土壌微生物画分を得た。土壌微生物をメンブランフィルター上に固定し、酸素電極に装着した。スターラーを攪拌し、空気飽和条件でベースラインを安定化させたのち、1%酵母エキス1.0mlを添加後、スターラーの攪拌を15分間停止して酸素供給を制限条件下での呼吸活性(RA-U)を測定した、その後スターラーの攪拌を再開し、酸素飽和条件下での呼吸活性(RA-S)を測定した。重回帰分析は、無料統計ソフトCollege Analysis(福井正康、福山大学作成)を用いた。【結果・考察】4種類の呼吸活性データ【(A)上層RA-U、(B)下層RA-U、(C)上層RA-S、(D)下層RA-S】を取得した。収量を目的変数とし、呼吸活性データ(A)-(D)を説明変数とした重回帰分析では有効な式は得られなかったが、2次加工データ(E) = (A) x (B)、(F) = (C) x (D)を説明変数とした場合に有効な重回帰式が現れた。収量 = -16.1940 x (E) + 1.6471 x (F) + 624.0757 (2017年度)、(外れ値2点を除く)収量 = 8.9545 x (E) - 4.908 x (F) + 470.2810 (2018年度)また、各年度で試験点数の多かった品種：はえぬき(2017年)、ひとめぼれ(2018)に絞り、同様の重回帰分析を行った結果より高い相関式が得られた。いずれの式も多重共線性の問題はなかった。以上、土壌微生物の呼吸活性を2次元加工することで収量との相関が認められた。¹⁾ Y.Hashimoto *et. al.*, *Microbes Environ.* Vol.23, 35-39.

P1-76

土壌微生物群集情報を用いた還元消毒成否判定法の開発

○李 哲揆^{1,2}, 飯田 敏也², 中保 一浩³, 大熊 盛也²

¹農工大・BASE, ²理研・BRC, ³農研機構・野菜花き

E-mail: cglee@go.tuat.ac.jp

土壌伝染性病害は土壌に生存する病原菌によって発生する病害であり、被害が長期間継続するなど防除が困難である場合が多い。これまではクロロピクリンといった、薬剤を用いた土壌くん蒸による防除が一般的であったが、環境保全型農業推進の観点から化学合成農薬を使用しない防除技術が注目されている。土壌還元消毒は、病害発生土壌にふすまや低濃度エタノールなどの有機物資材を投入し灌水したあと、農業用ポリエチレンフィルムで土壌表面を覆い、太陽熱で加温しながら土壌を強制的に還元状態にすることで、土壌中に存在する病原菌を死滅させる方法である。また可溶性の有機質資材を用いることで、これまで消毒が困難であった土壌深層部までの消毒も可能となる。本手法は環境負荷が少ない土壌伝染性病害防除法として、日本だけでなく中国やアメリカを中心に利用が広がっている。しかし、その消毒効果は地温や灌水量など条件に大きく左右されるため、圃場では安定しない。従って現場では消毒処理後の簡便な成否判定法が求められている。演者らはこれまで7道県11地域のトマト青枯病および萎凋病汚染圃場を対象とし、発酵食物残渣である、糖含有珪藻土を用いた還元消毒を実施してきた。これらの土壌について16Sアンプリコンシーケンスを用いて、消毒前後の原核生物群集の変化調べた。その結果、消毒が成功した土壌では、Clostridiaに属する細菌が特異的に増えていることを明らかにした。そこで、この微生物の挙動と還元消毒成否との関係性を調べることで、還元消毒診断指標微生物としての有用性を評価した。増殖したClostridia群は3つのクラスターに別れ、それぞれの微生物群に特徴的なプライマーを合計20種設計した。Real-time PCRを用いて土壌中での増幅産物の濃度を測定し、還元消毒の成否との関係について決定木分析を用いて明らかにした。その結果、1種類のプライマーを用い、還元消毒前後の増幅産物濃度を調べることで、77.8%の確率で消毒の成否を判定できることがわかった。また増幅産物のシーケンスを行った結果、Clostridiaだけではなく、BacilliやAcidobacteriaといった微生物が増えていた。

P1-77

メタトランスクリプトーム解析を用いたマグネタイトナノ粒子が酢酸資化性メタン生成に与える影響の調査

○稲葉 涼, 高妻 篤史, 渡邊 一哉

東京薬科大学

E-mail: ryo.inaba73@gmail.com

【背景・目的】メタン発酵は糞尿や食物残渣などのバイオマス廃棄物を処理し、燃料となるバイオガスを得る嫌気消化法として広く利用されている。しかし、中間代謝産物の蓄積とそれに伴う pH の低下による微生物の不活性化が頻繁に起こる等、運転が難しい技術として知られている。嫌気消化は様々な微生物が触媒する一連の代謝反応系により進行し、最終ステップのメタン生成はアーキア（メタン菌）が担う。この反応系において、メタン菌と共生菌（メタン生成菌に水素などの基質を提供する発酵細菌）の間の還元力の受け渡し（種間電子伝達、Interspecies Electron Transfer: IET）が律速段階とされている。嫌気消化において主要な種間電子伝達は共生菌が有機物を代謝した時に生じた水素を介したもの（Hydrogen-mediated IET）と考えられている。一方、もう一つの種間電子伝達として直接的電子伝達（Direct Interspecies Electron Transfer: DIET）が最近提唱された。これは、微生物同士が付着して直接的に電子をやり取りする現象である。近年メタン発酵を行う菌叢に導電性微粒子を加えると DIET が誘発され、メタン発酵が加速されることが報告された。導電性物質添加によるメタン発酵促進機構は環境条件に依存すると考えられるが、その詳細について調査はなされていない。そこで本研究では連続攪拌下での土壌由来の嫌気性菌源においてマグネタイトナノ粒子が酢酸資化性メタン生成に及ぼす影響を調査した。【方法・結果】連続攪拌下での土壌由来の嫌気性菌源にマグネタイトナノ粒子を加えたサンプルを調整し、バッチ培養を行った。化学分析の結果、マグネタイトの添加によりメタン生成速度が上昇した。その際の菌叢を 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析により調べたところ、酢酸資化性メタン菌 *Methanosarcina* の割合が増加していたが、DIET に関与する菌叢は得られなかった。同条件のサンプルのメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析により *Methanosarcina* の優先化が確認された。優先化していた *Methanosarcina* のメタン生成経路の主要遺伝子の相対発現量を比較したところ、水素資化性メタン生成経路の発現は低く、酢酸資化性メタン生成経路が主要な反応であることが明らかとなった。以上の結果から、導電性ナノ粒子の添加は連続攪拌条件において酢酸資化性メタン生成を促進することが明らかとなった。

P1-78

メタン生成菌との共生培養を用いたリグニン関連物質分解微生物の分離培養

○持丸 華子

産総研・地圏資源

世界の天然ガス資源に含まれるメタンの約 20% は微生物により生産されたと推定されている。地上から隔絶された研究対象の地下深部天然ガス貯留層中には 100 万年以前に堆積した有機物が存在している。堆積物中では有機物は重縮合を繰り返し巨大な分子量を持つ難分解性の有機物に変化していると考えられおり、メタン生成へと続く根源有機物の種類やそれを分解する微生物については明らかではない。そこで本研究では、地下深部油ガス田におけるメタン生成機構を解明することを目的とし、国内の様々な油ガス田の試料から、リグニン関連物質であるメトキシ芳香族化合物を分解する微生物を網羅的に分離し、その生態を解明する。国内油ガス田から地層水を採取し、リグニン関連物質としてメトキシ芳香族化合物を基質として培養を行った。このメトキシ化合物の分解産物となり得る水素や酢酸をメタン生成古細菌がメタンに変えることでメトキシ化合物分解微生物の生育が促進されるという仮説を立て、水素利用または酢酸利用のメタン生成古細菌を添加する共生培養法を用いてメトキシ化合物分解微生物の集積培養を行った。試験管に水素利用または酢酸利用メタン生成古細菌を共生菌として基質と共にあらかじめ添加し、油ガス田試料の希釈培養を行った。この共生を用いた希釈培養を繰り返した後、集積された細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。メタン生成菌を添加せずに希釈培養を行った系では、希釈倍率が高くなるとメトキシ化合物の分解が見られなくなったのに対し、メタン生成菌を共生菌として添加した系では、高希釈率の培地においても良好なメトキシ化合物の分解が見られた。多くの系でメタン生成菌の存在により、メトキシ化合物の分解が促進されており、メトキシ基の分解とメタン生成が密接な共生関係により成り立っていることが示唆された。集積された細菌について 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、採取地や培養温度などが異なる複数の試料から、既知種との相同性が 90% 以下の細菌が 40-100% の存在率で検出された。この中で既知種とそれぞれ 88-90% 離れた新規微生物は 5 種類以上確認され、共生培養法がメトキシ化合物分解微生物の培養に有効である事が明らかとなった。本研究の一部は、公益財団法人発酵研究所平成 29 年度一般研究助成による。

P1-79

Investigation of a hydrocarbon pollutant-degrading bacterial consortium and *Bradyrhizobium* sp. strain KK5

○Yuna Tomiyama, Jiro F. Mori, Robert A. Kanaly
Grad. Sch. of Nanobioscience., Yokohama City Univ.

Petroleum products such as gasoline and diesel fuel consist of many kinds of hydrocarbon compounds such as branched and straight chain alkanes, aromatics, polyaromatics and aromatics with alkyl chains. Some compounds may exhibit high toxicity, mutagenicity or carcinogenicity, and therefore there is interest to study the fates of these chemicals in the environment. Soil bacteria possess powerful abilities to biodegrade hydrocarbons released into the environment. Understanding the interrelationships of bacterial groups involved in hydrocarbon pollutant biodegradation is useful for understanding the fates of pollutants and for elucidating the roles of bacterial species. In this work, a microbial consortium that was recovered from soil was investigated in regard to its growth on and biodegradation of a model diesel fuel (0.2% w/v), that consisted of greater than 40 hydrocarbon compounds including *n*-alkanes, monoaromatics, polycyclic aromatics and polycyclic aromatic heterocycles. Quantitative analyses by gas chromatography (GC) showed that after 14 days most compounds were biodegraded greater than 80% and by 28 days were undetectable. A slow-growing individual isolate from the consortium was isolated on the alkylated-polyaromatic hydrocarbon 1-dodecylanthracene (1-DDN) and identified by 16S rDNA sequencing to belong to the genus *Bradyrhizobium*. *Bradyrhizobium* sp. KK5 appeared to grow on 1-DDN as the sole source of carbon and energy and was investigated further by metabolite analyses.

P2-01

クロメジナ腸内由来 *Microbulbifer* sp. が持つセルラーゼ遺伝子のクローニング

○大西 健一郎, 杉本 侑大, 鈴木 聡
愛媛大・CMES

E-mail: d901001h@mails.cc.ehime-u.ac.jp

【背景と目的】セルロースは植物中に豊富に含まれており、地球上の資源量はたいへん多い。原核生物や真菌などにはセルロースを分解、利用しているものが多いが、脊椎動物は自身で分解せず、腸内共生細菌がセルロースを分解する。海産魚類では、セルラーゼ産生菌を単離した報告はあるが、酵素の生化学的な知見の報告はない。我々は雑食性魚であるクロメジナ (*Girella leonina*) の腸内からセルラーゼ産生菌を単離した。本研究では、セルロース分解株 *Microbulbifer* sp. GL-2 株の全ゲノム解析からゲノム上に存在するセルラーゼ候補遺伝子のクローニングと発現を行なった。

【結果】PacBio RS II を用いた次世代シーケンスによって得られたリードを SMRT によってアセンブルし、環状化した 1 つのコンティグを得た。GL-2 株ゲノムは全長 4.9 Mbp、GC 含量が 49.6% であった。DFAST によるアノテーションの結果、4973 個の ORF が得られた。dbCAN2 を用い、セルロース分解に関わるドメインを標的とした検索により、12 個の ORF がセルラーゼ候補遺伝子として得られた。これらを TA クローニングによってプラスミド pGEM-TEasy Vector にライゲーションし、*E. coli* DH5 α 株に形質転換した。得られた形質転換体をカルボキシメチルセルロース (CMC) を含む LB 培地で培養し、プレートにコンゴレッド染色することで透明なハローを形成するセルラーゼ活性陽性コロニーを選択した。その結果、CDS#2744、4155、4160 の 3 つの ORF 産物でセルラーゼ活性が見られた。残り 9 個の ORF ではプレート上でセルラーゼ活性は見られなかった。活性が陽性のものはそれぞれ Glycoside hydrolase family の 5、8 および 9 のドメインを有していた。これらのドメインはエンドグルカナーゼの酵素に多く見られるものであることから、CDS#2744、4155、4160 はエンドグルカナーゼである可能性がある。本研究によって海産魚類腸内細菌からセルロース分解に関わる酵素を初めて特定した。今後、今回特定した酵素のより詳細な性状を明らかにすることを目指す。

P2-02

飢餓状態の海洋細菌のプロテアーゼ産生に及ぼす有機物の効果

○新藤 紗音, 大林 由美子, 鈴木 聡

愛媛大・CMES

E-mail: d613022x@mails.cc.ehime-u.ac.jp

[研究の背景と目的] 細菌の細胞外酵素による有機物分解は、水圏生態系における物質循環に重要な初期反応である。海洋は巨大な有機物貯蔵庫であり、生物由来高分子タンパク質も存在しているが、土壌等の陸上環境に比べると多くの場合貧栄養状態である。海洋細菌が海水中のタンパク質を利用する過程では、エンド型プロテアーゼによる高分子タンパク質のオリゴペプチド化とエキソ型プロテアーゼによるアミノ酸への分解が行われている。この過程には、細菌のみならず原生生物等のプロテアーゼも関与するが、酵素産生において様々な微生物がどのようなトリガーで酵素の産生を調節しているかは分かっていない。そこで、海洋微生物によるタンパク質利用・変換機能を解明するために、本研究では飢餓状態においた細菌が様々な有機物の添加に応答して増殖する際のプロテアーゼ産生変化に焦点を当てた。[方法] 有機物として、多糖（セルロース）、単糖（グルコース）、ペプチド（ペプトン）、アミノ酸（20種混合アミノ酸）を用いた。四国沿岸海水から単離した γ -Proteobacteria の中から、アミノペプチダーゼを産生する *Photobacterium damsela* O4Ya311 株を実験に使用した。飢餓状態の細菌（4℃の滅菌人工海水中で15日間インキュベートした細菌）に有機物を添加後、細胞外プロテアーゼ活性を測定した。同時に、菌数測定を行った。また、瀬戸内海海水と宇和海養殖場海水中のプロテアーゼ活性測定を行い、単離株のプロテアーゼプロファイルとの比較を行った。[結果と考察] O4Ya311 株では、ペプトンを添加した時のみ、菌数増加とプロテアーゼ産生が見られた。ペプトンの添加量は、1mg/L ではプロテアーゼ活性は検出されなかったが、10mg/L でアミノペプチダーゼが産生された。アミノ酸、糖類の添加ではプロテアーゼは産生されなかった。この結果から、本株プロテアーゼは酵素基質であるペプチドの存在下で産生されることがわかった。海水中的プロテアーゼ活性分析では、既報と同様に多様な基質を分解するプロファイルが得られた。また、有機物が豊富な養殖場海水のほうが瀬戸内海海水よりもプロテアーゼ活性が高かった。天然海水中においてもペプチド性基質が多い場合にプロテアーゼ活性が高い可能性がある。

P2-03

ヒトデ類の体腔液における微生物群集構造：病原菌近縁種は普遍的に優占するか

○斎藤 貴大¹, 神崎 隼人¹, 高木 善弘², 澤山 茂樹¹, 中川 聡^{1,2}

¹京都大・院農, ²海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門

E-mail: saito.takahiro.26x@kyoto-u.jp

【目的】 棘皮動物の体腔液は、脊椎動物の血液とリンパ液を合わせたものに相当する。体腔液には体腔細胞（免疫細胞）や抗菌物質が含まれることから、一般に無菌的であると考えられてきた。しかし、近年我々は、北海道の沿岸域に生息するマヒトデ（最もありふれたヒトデ）の体腔液中に *Helicobacter* 属（ヒトの胃癌・胃潰瘍原因菌であるピロリ菌など多数の病原菌を含む）に近縁な性状未知の新規微生物が優占して生息することを発見した。これは、*Helicobacter* 属の近縁細菌が、無脊椎動物に見出された初の例であると同時に、消化管以外に住み着く初の報告例となった。ヒトデ類は北海道に限らず本州沿岸にも広く分布しているが、その体腔液に特異な病原菌近縁種が優占することは安全・安心な水産資源の持続的生産にむけた調査・対策の必要性を示唆している。そこで本研究では、日本の主要な漁港（特定第三種漁港）を中心に、日本各地の浅海に生息するヒトデ類を採取し、それらの体腔液に生息する微生物の多様性・群集構造について包括的な知見を得ることを目的とした。

【方法】 これまで、北海道、東北、北陸、瀬戸内において、マヒトデ、イトマキヒトデ、ヤツデヒトデ等を採取し、各個体の体表や体腔液、周辺海水中の微生物を対象とする 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った。

【結果・考察】 これまでのところ、解析した全ての体腔液試料から微生物が普遍的に検出された。採取された各ヒトデの体腔液中に検出された微生物群集の α 多様性は周辺海水よりも有意に低く、個体差が大きいものの、多くの個体において体腔液に周辺海水にはほとんど検出されない特異な微生物が優占して検出された。例えばマヒトデでは、上記 *Helicobacter* 属近縁細菌に加え、*Thiotrichales* 目細菌が全リードの9割を超える個体が多数見られた。またイトマキヒトデでは、採取地点に関わらず *Spirochaetales* 目細菌や *Entomoplasmatales* 目細菌が優占する個体が多いなど、ヒトデの種類や採取地点に関わらず、その体腔液中に特異なヒト病原菌近縁種が優占することが示唆されつつある。現在、中国・四国地方に生息するヒトデ類においても解析を進めている。

P2-04

魚類養殖場における細菌群集構造の変動解析

○横地 駿¹, 中瀬 玄德², 家戸 敬太郎², 谷口 亮人³, 江口 充³¹近畿大・院農, ²近畿大・水研, ³近畿大・農

E-mail: 1933660006n@nara.kindai.ac.jp

【目的】養殖場では、養殖由来の残餌や排泄物などの多くの有機物が環境に負荷されている。一方で、植物プランクトン由来の有機物の割合も予想以上に大きいことが報告されている。養殖場水域における物質循環に寄与している細菌群を理解することが、持続的な養殖を実現するうえで不可欠である。本研究では、養殖場水域で活発に増殖している細菌群の群集構造の経時変化を、プロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた方法で調べた。

【方法】和歌山県田辺湾の魚類養殖場における養殖生簀のある St. O と養殖生簀のない St. H (いずれも水深約 15 m) にて、約 5 年間にわたり、水深 1 m および海底直上 1 m (B-1 m) から海水を採取した。採取した試料は、目合 200 μm ナイロンメッシュで前ろ過した。BrdU (終濃度 1 μM) を加え、現場海水温付近で 3 時間培養した。培養後、孔径 3 μm ポリカーボネートフィルターおよび孔径 0.22 μm カートリッジフィルターで試料をろ過した。DNA を抽出・精製した後、BrdU 標識 DNA を分取し、ITS 領域に基づくフラグメント解析を行った。

【結果】調査期間中に、水温は 12.18 ~ 28.55 °C (20.77 ± 4.81 °C) で変動していた。合計で細菌 199 種が検出された: St. O の水深 1 m で 10 ~ 43 種および水深 B-1 m で 6 ~ 44 種、ならびに St. H の水深 1 m で 10 ~ 39 種および水深 B-1 m で 9 ~ 35 種であった。観測地点や水深による群集構造の差はほとんどみられなかった。これらの種のうち、OTU 687.2 に代表される細菌のように、通年で優占する“generalist”がいた。一方で、低水温期に優占する OTU964.4 のように、毎年ある季節にだけ活発になる“specialist”もいた。活発に増殖している細菌には季節的変動があり、物質循環に寄与している細菌が季節で変化していることを示す。Chl. a 濃度は、0.14 ~ 8.09 μg/L (1.19 ± 0.56 μg/L) で変動していた。Chl. a 濃度と正の相関があった細菌種は、St. O の水深 1 m および B-1 m でいずれも 14 種、ならびに St. H の水深 1 m および B-1 m でいずれも 9 種であった。2 か月後の時差相関があったのは、St. O の水深 1 m で 14 種、水深 B-1 m で 11 種、および St. H の水深 1 m で 10 種、水深 B-1 m で 17 種であった。Chl. a 濃度と正の相関があった細菌群は、新鮮な光合成産物を好むグループ、時差相関があった細菌群は、植物プランクトンの死骸などを好むグループであることが考えられる。

P2-05

閉鎖性内湾底層における無機態窒素とアンモニア酸化古細菌の動態

○伊藤 尚斗¹, 大塚 健人¹, 森 郁晃¹, 内田 淳², 青島 隆², 近藤 能子¹, 和田 実¹¹長崎大・院水産・環境科学, ²長崎大・水産

【目的】閉鎖的な内湾では底層の貧酸素化に伴い堆積物から溶出する栄養塩フラックスが増大し、水柱の生物地球化学過程に大きな影響を及ぼす。主な溶出栄養塩の一つであるアンモニアは底層水中の硝化作用によって亜硝酸や硝酸に変換されると考えられるが、貧酸素化した内湾の硝化細菌の活動については未だ不明な点が多い。本研究では季節的に貧酸素化する長崎県の大村湾底層において無機態窒素の濃度変化とアンモニア酸化古細菌 *Thaumarchaea* の現存量との関連を明らかにすることを目指した。【方法】2018 年 5 - 10 月に大村湾北部、中央部、南部及び沿岸部で観測を行った。各測点の環境要因 (水温・塩分・溶存酸素量) は多項目水質計 (AAQ177) で鉛直断面観測した。各測点で CTD に付属したニスキン採水器を用いて海水を採取し、採取した海水の無機態栄養塩濃度をオートアナライザー QuAAtro 39 を用いて定量した。海水から抽出した DNA を鋳型として、海洋の主要なアンモニア酸化古細菌である *Thaumarchaea* 16S rRNA 遺伝子 (rrs) に特異的なプライマーを用いて定量 PCR を行った。【結果】全観測点においてアンモニア濃度は 6 月下旬から 8 月上旬にかけて底層付近で上昇した。また、底層で亜硝酸は 8 月に顕著に増加し、硝酸は 9 月に増加する傾向を示した。 *Thaumarchaea* の rrs コピー数も概ね無機態窒素濃度と同様の増加傾向を示し、8 月下旬から 9 月に最大値 ($1.4 \times 10^8 - 5.4 \times 10^8$ copy/L) となった。 *Thaumarchaea* の rrs コピー数は水温と亜硝酸に対して正の相関 (水温; $r = 0.70$, $p < 0.05$ 、亜硝酸; $r = 0.47$, $p < 0.05$) を、溶存酸素量に対して負の相関 ($r = -0.44$, $p < 0.05$) を示した。これらのことから大村湾底層における *Thaumarchaea* は水温に大きく影響され、低酸素条件下に適応して現存量を増加させることが示唆された。

P2-06

化学合成独立栄養細菌は内湾の酸性化を抑制する

○大塚 健人¹, 鷺尾 昂祐¹, 森 郁晃¹, 内田 淳², 青島 隆², 石松 惇³, 和田 実¹¹長崎大・院水産・環境科学, ²長崎大・水産, ³長崎大・海セ

【目的】海洋酸性化は海洋表層だけでなく底層においても顕在化しやすい。閉鎖性内湾では夏季に底層の微生物呼吸による酸素消費と二酸化炭素生成によって貧酸素化と酸性化が同時進行し、特に底生生態系に大きな影響を与えることが危惧される。我々は季節的な貧酸素海域である長崎県・大村湾において、溶存酸素量 (Dissolved Oxygen; DO) と pH の間に強い正の相関を確認したが、貧酸素後期には DO が顕著に低下してもあまり酸性化しない水塊 (Less Acidified Hypoxic Water mass; LAHW) が生じることを見出した (大塚ら、平成 31 年度 日本水産学会春季大会)。この水塊形成の微生物学的要因として酸素と二酸化炭素を同時に消費する化学合成独立栄養細菌が関わっている可能性があり、本研究ではその検証を目的とした。

【方法】2017 年 6-10 月と 2018 年 4-10 月に大村湾中央部、南部、北部および沿岸部 (計 4 測点) の底層で採水した。採水試料からゲノム DNA を抽出し細菌および古細菌の 16S rRNA アンプリコン解析を行った。また、貧酸素期とその前後の海水を暗所培養 (24 時間) して DO と溶存無機炭素 (Dissolved Inorganic Carbon; DIC) の変化量を調べた。

【結果】2017 年 8 月後半に南部において環境要因から予測されるよりも高 pH の水塊 (実測値とモデル予測値の差=0.161) が観測され、その前後で化学合成独立栄養細菌の一種であるアンモニア酸化古細菌 (*Thaumarchaeota*) と硫酸化細菌 (SUP05) の存在割合が、それぞれ 0.54 から 15.9%、0.96 から 12.2% に上昇していた。2018 年には湾中央部の LAHW で同様の傾向を示した。2018 年 8 月後半と 10 月に中央部の海水を培養したところ、DIC が減少し、特にアンモニウムイオンを添加したサンプルで DIC の減少が顕著だった。これらの結果は、化学合成独立栄養細菌による酸素の消費と二酸化炭素の固定が貧酸素水塊における酸性化の緩和に寄与することを強く示唆している。

P2-07

パルマ藻・珪藻の祖先的形質の解明に向けた比較ゲノム解析

○伴 広輝¹, Romain Blanc-Mathieu¹, 桑田 晃², 佐藤 晋也³, 吉川 伸哉³, 一宮 睦雄⁴, 緒方 博之¹¹京都大・化研, ²東北区水産研究所, ³福井県大・海洋, ⁴熊本県大・環境

E-mail: ban@kuicr.kyoto-u.ac.jp

パルマ藻は珪藻の姉妹群であり、珪藻と同様にシリカの殻を持つ単細胞性の微細藻類である。珪藻は海洋や淡水中に広く分布し、非常に富んだ多様性を持ち最も繁栄している藻類である。また珪藻は地球全体の一次生産の 20% 以上を担い、海洋生態系全体を支えている。一方でパルマ藻は、珪藻と同様に海洋で広く分布しているにも関わらず、その多様性は乏しく、また現存量も高くない。この二つの系統の存在は対照的であり、これらに対する比較ゲノム解析は現在の珪藻の繁栄や進化の過程を考える上で重要であると考えられる。

我々はパルマ藻と珪藻の共通祖先に近いと考えられる形質を持ったパルマ藻を単離培養することに成功した。一般的なパルマ藻の細胞は 5 から 8 枚のシリカの殻で覆われているのに対し、このパルマ藻の細胞は無数の鱗状の殻で覆われており、この形質はパルマ藻と珪藻の共通祖先に推測されている形質と類似している。この観察を裏付けるように、祖先的パルマ藻は二つの系統間の分子系統樹上で根元に近い場所に位置する。本研究では、祖先的パルマ藻類の特徴を明らかにするため、同時に単離された他のパルマ藻 5 種 6 株のゲノムと既に解読が終了している数種の珪藻類のゲノムと共に比較ゲノム解析を行い、祖先的パルマ藻が実際に特徴的なゲノム構造を持っているかどうかを明らかにする。本発表では、系統解析や遺伝子の共直線性、進化速度といったこれまでの解析結果について報告する。

P2-08

養殖場から分離した新規*Roseobacter*属細菌に関する研究

○村松 壮¹, 高部 由紀¹, 高市 真一², 花田 智¹

¹首都大・院理, ²東京農大・生命

E-mail: so_6jqk@outlook.jp

一般に海洋性細菌は難培養性の菌株を含むことが知られ、海洋における主要な系統群に属する細菌の多くは実験室での分離培養に至っていない。主要系統群の1つである*Roseobacter*系統群は海洋表層において10～20%を占有するグループであり、そこに含まれる培養が比較的容易である株は数々の生理・生態学的研究に用いられてきた。しかし、この系統群に含まれる*Roseobacter*属細菌については報告例が少なく、現在までに3種しか記載されていない。我々は愛媛県愛南町の真鯛養殖場海水から*Roseobacter*系統群に属する多数の菌株の分離に成功しており、そのうち*Roseobacter*属の新種とすべきAI77株についてその系統学および生理学的比較研究を行った。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、AI77株は同属の*R. ponti*, *R. denitrificans*, *R. litoralis*とそれぞれ97.5, 97.0および97.0%の相同性を示した。最近縁株の*R. ponti*が光合成活性を示さないのに対し、AI77株は好気条件においてバクテリオクロフィルおよびカロテノイドを合成し、嫌気光条件では生育を示さないことから好気性光合成細菌であると判断した。また、*R. denitrificans*, *R. litoralis*と比較し基質利用の多様性が低く、グルコース、ピルビン酸、コハク酸、マロン酸などの基質を利用できないことも分かった。本研究の結果に基づき、AI77株を*Roseobacter*属における新規好気性光合成細菌として提案する予定である。

P2-09

サンゴの生育を阻害する除草剤ジウロンの分解微生物の分離と解析

與那覇 志人¹, 會田 祥平¹, ○佐藤 龍之介¹, 永山 敦士², 伊藤 通浩³, 新里 尚也³

¹琉球大・工, ²沖縄県農林水産部, ³琉球大・熱生研

【目的】ジウロン (DCMU; 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素) は光合成阻害型除草剤である。沖縄県のサトウキビ畑で多用されており、沖縄島や石垣島のサンゴ礁付近の河口域で残留が認められている。共生する微細藻類に栄養を依存するサンゴの生育を阻害することから、土壌流出に伴うジウロンのサンゴ礁への悪影響が懸念されている。これまでに、ジウロンを単独で分解・資化する微生物株の報告は無いものの、ジウロンを分解する複合微生物系の報告がある。一方で、我が国の土壌に散布されたジウロンの分解を担う微生物については知見がない。微生物は元々の棲息環境には定着しやすいため、ジウロン分解微生物を用いた沖縄島の環境修復には、沖縄島由来の微生物の活用が有望である。そこで、本研究では、沖縄島の環境試料よりジウロン分解微生物を分離し、その特徴を解明することを目的とした。【方法】沖縄県内の5地点(西原町、今帰仁村、本部町(瀬底島)それぞれ1地点、読谷村2地点)において計20の土壌試料を採取し、それぞれから微生物画分を得た。これらをジウロン(100 ppm)を含む無機液体培地に接種して複合微生物培養系を構築し、5度植え継ぎを行った。ジウロンの定量には高速液体クロマトグラフィーを用いた。複合培養系の微生物叢解析は、MiSeqを用いた16S rRNA 遺伝子V3-V4領域のアンプリコンシーケンシングにより行った。複合培養系からのジウロン分解微生物の分離にはジウロンを含む1/3R2A寒天培地を用いた。【結果・考察】構築した20の複合培養系のうち19でジウロンが減少しなかった。一方、本部町(瀬底島)のサトウキビ畑由来の培養系ではジウロンが減少した。この培養系を段階希釈し、分解能を保持する培養系と、分解能を失った培養系を作製した。これらの微生物叢を比較したところ、分解能を示す培養系の全てで、16S rRNA 遺伝子部分配列が公知データベース中の*Pseudonocardia*属細菌株のそれと100%一致するOTUが検出された一方、分解能を示さない培養系の全てで当該OTUが検出されなかった。当該OTUの16SrRNA 遺伝子部分配列を元に特異的検出プライマーを作製し、寒天培地上に生育した約600株をスクリーニングして当該OTUに属する13株を得た。これらは実際にジウロン分解能を示した。*Pseudonocardia*属細菌はジウロン分解菌としては報告がない。現在、本菌株のジウロン資化能等の特徴と、ゲノム塩基配列を解析中である。

P2-10

水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) 分解能を有する *Methanomethylovorans* 属古細菌の分離培養

○栗原 拓也¹, 倉島 優仁¹, 段下 剛志², 竹村 泰幸³, 惣中 英章⁴, 堀 沙織里¹, 重松 亨¹, 井口 晃徳¹, 珠坪 一晃³

¹新潟薬大, ²徳山高専, ³国環研, ⁴長岡技大

【目的】近年、スマートフォンなどの電子製品の生産量増加に伴い、TMAHやイソプロパノール (IPA) 等の有機化学物質を含む電子産業廃水の排出量が増大している。我々はUp-flow anaerobic sludge blanket (UASB) 法メタン発酵プロセスによるTMAHおよびIPA含有廃水の処理性能を評価し、その実用性や優位性を示してきた。TMAHを分解するUASB汚泥の16S rRNA遺伝子に基づく微生物群集構造解析を行った結果、*Methanomethylovorans*属 (メタン生成古細菌) の未培養phylogroupが優占していた。回分分解試験の結果から、この未培養phylogroupはTMAHを直接的に分解、メタン化している可能性が示されたが、これまでの*Methanomethylovorans*属古細菌がTMAH分解能を有する報告はなく、その分解メカニズムも不明である。本研究はTMAH分解能が示された*Methanomethylovorans*属古細菌の分離培養を目的とした。

【方法】分離源にはTMAH含有合成廃水 (TMAH; 700, IPA; 700, Yeast extract; 100 mg-COD/L) を低温 (18-19℃) で処理するUASB汚泥を用いた。分離培養には、TMAHを主要基質としたWiddel培地を用いた限界希釈法および6 well plate methodによるコロニー形成法を適用した。補酵素F₄₂₀の自家蛍光観察およびFluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を適用し集積確認を行った。

【結果・考察】限界希釈法による回分培養において、130 day後の培養液を顕微鏡観察したところ、F₄₂₀自家蛍光を発するサルシナ型球菌が優占していた。この培養液を植種とし、6 well plate methodによりコロニーを形成させた。出現したコロニーを液体培地に植菌し継代培養を3回繰り返した結果、標的の*Methanomethylovorans*属古細菌と数種の桿菌で占められる集積培養液を得た。この培養液を植種とし、バンコマイシン (100 μg/ml) を添加した液体培地で1回継代培養した結果、ほぼ*Methanomethylovorans*属古細菌で構成された培養液が得られ、標的古細菌の分離に成功したものと判断した。今後は得られた培養液中の分離株の純粋培養を行い、分離が成功したことを確認する。その後、分離株の機能および生理学的性質の調査を行う。

P2-11

嫌気性アンモニア酸化細菌 "*Candidatus Scalindua sp.*" と "*Candidatus Brocadia sinica*" の維持係数の定量

○上垣内 厚志, Lei Zhang, 山下 柚子, 小林 香苗, 岡部 聡

北海道大・院工

E-mail: atsushigaito@eis.hokudai.ac.jp

嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) 細菌は、広範な自然環境や廃水処理槽から検出されており、窒素循環や工学的利用において重要な役割を担っている。環境中において、アナモックス細菌の棲み分けが存在することは明らかであるものの、その原因に関する研究は非常に限られており、現在までに明らかになっていない。また、研究室規模の長期間培養においても、培養系内でアナモックス細菌の優占種が遷移することが複数報告されているが、その原因は不明である。

アナモックス細菌の基質であるアンモニウムと亜硝酸の自然環境中での濃度は極めて低く、このような環境におけるアナモックス細菌の増殖速度は極めて小さいと考えられる。細菌による基質消費は、菌体の増殖のための基質消費と、維持代謝のための基質消費 (維持係数) からなり、浸透圧調整など、菌体の維持には一定のエネルギー消費が必要となる。増殖速度が小さくなるにつれ、菌体維持のために使用されるエネルギーの割合は相対的に大きくなるため、自然環境中のような貧栄養環境においては、維持係数が小さい方が生存競争で有利となる。故に、菌体維持に関する知見は、アナモックス細菌の競合において非常に重要であるが、増殖速度を限りなく制限して培養することの難しさから、これまでに維持係数は定量されていない。

本研究では、膜分離型連続培養リアクターを用いて、槽内に菌体を完全に保持した状態で基質濃度を制限することにより、限りなく0に近い増殖速度での培養に成功した。2種類のアナモックス細菌、"*Ca. Scalindua sp.*" (海洋性) と、"*Ca. Brocadia sinica*" (淡水性) の維持係数がそれぞれ、0.012、0.019 mg-N-NH₄⁺ / mg-BSA / hであることを実験的に定量し、maintenance rate (h⁻¹) と、増殖に必要な最小基質濃度 (S_{min}, μM) についても算出した。

海洋に比べて基質が豊富な廃水処理槽から検出が報告されている "*Ca. Brocadia sinica*" が "*Ca. Scalindua sp.*" の約5倍のS_{min}を持つことが明らかとなり、菌体維持に必要な基質消費の差が、アナモックス細菌の棲み分けに影響を与えていることが示唆された。

P2-12

EGSB リアクターの嫌気性バルキングに關与する未培養糸状性微生物の分離と培養

○原田 淳¹, 山口 剛士², 成廣 隆³, 中野 淳⁴, 山田 剛史¹

¹豊橋技大・院工, ²松江高専・環境建設工, ³産総研・生物プロセス, ⁴住友重機械エンバイロメント

E-mail: j141853@edu.tut.ac.jp

Expanded Granular sludge bed (EGSB) リアクターは、食品製造廃水を中心とした中・高濃度の有機性廃水を処理する中核的な技術となっている。EGSB リアクターの普及や適用廃水種の拡大に伴って、ある種の糸状性微生物の異常増殖によりリアクター内のグラニュール汚泥が浮上・流出してしまう現象 (嫌気性バルキング) がしばしば発生している。食品製造廃水を処理する中温EGSB リアクターで発生した嫌気性バルキングでは、メタノサエタ属アーキア (1種) およびアナエロリネア綱細菌 (2種) の未培養糸状性微生物が当該嫌気性バルキングに關与していることが示唆されたが、これらの微生物の微生物機能情報すら明らかになっていない。EGSB リアクターの嫌気性バルキングのメカニズムを明らかにするため、本研究では、当該糸状性微生物の分離・培養を試みた。まず、健全なグラニュール汚泥の切片を作製した後、メタノサエタ属アーキアやアナエロリネア綱細菌に特異的なDNAプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション法によって、これらの微生物群のグラニュール汚泥における空間分布を評価した。その結果、アナエロリネア綱細菌はグラニュール汚泥表面に分布しているのに対して、メタノサエタ属アーキアはグラニュール汚泥内部に分布していることが明らかとなった。グラニュール汚泥の形態学的特徴をもとに、アナエロリネア綱細菌は廃水中の糖成分を利用している可能性が示唆されたため、10 mM グルコースと0.1 % 酵母抽出液を基質とした希釈集積培養を行った。アナエロリネア綱細菌の集積割合は、蛍光in situハイブリダイゼーション法および16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析によって評価した。既存のアナエロリネア綱細菌が耐性を持つリファンピシンやアンピシリンを用いた希釈培養やロールチューブ法を繰り返すことによって、バルキング原因菌として認知されたアナエロリネア綱細菌が50%以上優占する集積培養に成功した。集積培養系内には、アナエロリネア綱細菌に特異的なDNAプローブに反応する糸状性細菌が豊富に存在することも確認した。

P2-13

メタン発酵消化液による土壤伝染性植物病原菌の生育抑制

○白井 薫¹, 大川 直人¹, 田中 栄爾², 古賀 博則², 高原 浩之², 楠部 孝誠¹, 河井 重幸¹, 馬場 保徳¹

¹石川県立大・生物資源研, ²石川県立大・生物資源環境

E-mail: ybaba@ishikawa-pu.ac.jp

【背景・目的】

世界の農作物生産量の約16%が、微生物による病害によって、毎年失われ続けている。なかでも、*Fusarium oxysporum* はおよそ140種の作物に感染する宿主領域の広い土壤伝染性の植物病原菌であり、わが国でもハウレンソウやトマトに難防除病害である萎凋病をもたらす問題となっている。現在のところ、燻蒸剤による土壤消毒が実施されているが、燻蒸剤は毒性の強い化合物であるため、作業者へ危険が及ぶことから、新しい防除法が求められている。これを背景に近年、“非病原微生物により植物病原微生物を抑制する”微生物農薬が注目され、わが国でも実用化されはじめています。本研究では、有効利用が求められているメタン発酵消化液 (バイオガスプラントから排出される発酵残液) に注目し、湛水条件下での土壤伝染性植物病原菌に対する微生物農薬の供給資源としての可能性を探った。

【方法・結果・考察】

ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に生育させた植物病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (FOS) をコルクボーラーで培地ごと打ち抜き、嫌気性液体培地に添加した。そこに、メタン発酵消化液を加えて、15℃から35℃までの複数の温度域にて最大7日間インキュベートした。また、メタン発酵消化液未接種の液体培地に、打ち抜いたFOSを添加し、同様にインキュベートしたものを対照区とした。

インキュベート後、液体培地からFOSを取り出し、PDA培地上に植菌した結果、メタン発酵消化液添加区のみFOSの生育が抑制された。メタン発酵消化液と共培養したFOSを走査型電子顕微鏡で観察したところ、菌糸の周りに細菌のバイオフィームが形成され、かつ、DAPI染色の結果、核が消失していることを確認した。このことから、メタン発酵消化液中に存在する細菌が、FOSの生育を抑制したものと期待された。そこで、当該細菌の分離を試みた結果、植物病原菌生育抑制効果を示す複数の細菌の分離に成功した。今後は、これらの分離株の最適な増殖条件および植物病原菌生育抑制効果を示す培養条件を明らかにし、メタン発酵消化液の微生物農薬としての利活用を目指す。

P2-14

植物成長微生物で強化したウキクサによる栄養塩除去効果の予測

○加藤 史章, 田中 靖浩, 遠山 忠, 森 一博

山梨大院・医工農

E-mail: g18tc005@yamanashi.ac.jp

【はじめに】水環境の富栄養化対策として、栄養塩除去が広がりを見せている。特に、経済の発展と人口の増加が著しい地域においては状況に合わせて多様な浄化手法の利用が求められている。植生浄化法は、維持管理が比較的容易でエネルギー消費やコストを低く抑えられることから、近年改めて注目される技術の一つといえる。しかし、植生が示す浄化効果は気象条件や水質の影響を強く受けるため、それら環境条件と植物種ごとの特性を加味した合理的な予測・判断の下に施設の計画、設計、維持管理する手法が必要である。本研究では、植物成長促進細菌 (PGPB) を活用して機能強化を図った場合を含むウキクサ植生による栄養塩除去実験の結果と、これまでに開発したウキクサによる栄養塩除去を各種栽培条件から予測するモデルとウキクサの環境応答パラメータを用いたシミュレーション結果を比較することで本予測手法の有効性を検討した。【方法】供試植物として2種類のウキクサ (*Spirodela polyrhiza*と *Lemna minor*) を使用した。また、植物の生長を促進することで植生浄化機能の強化が期待される PGPB には *Sinorhizobium* sp.SP4 を用いた。栄養塩除去実験では、PGPB で機能強化を図った場合を含む供試ウキクサを実下水二次処理水に植栽し経時的に栄養塩濃度を測定した。

【結果と考察】各種供試ウキクサを実下水二次処理水に植栽し、栄養塩除去の実測値を得た。その結果、ウキクサは窒素成分を除去する際、アンモニア態窒素を優先的に吸収し、アンモニア態窒素濃度が低下すると共に硝酸態窒素を吸収することで窒素成分の除去が達成されることを確認した。一方、栄養塩除去試験における温度、光、植物密度および栄養塩濃度を元に、1日あたりのバイオマス生産量、バイオマス中の栄養塩含有率、栄養塩吸収除去量をモデルから計算し、液中の栄養塩濃度の変化を予測した。その結果、ほぼ正確に実排水においても除去効果を予測できることが示された。特に、窒素については、アンモニア態と硝酸態の形態別に植物の応答モデルとパラメータを求めて予測モデルに組み込んだことにより、実測値に対して従来よりも高い再現性が得られるようになったものと考察された。

P2-15

塩素消毒後の細菌の塩濃度変化による再活性化

○野口 直暉, 伊藤 司

群馬大・院理工

E-mail: t191c038@gunma-u.ac.jp

【目的】日本の下水処理場の約9割が処理水の消毒に塩素を用いている。消毒によって病原性微生物は不活化され、河川や海域に放流される。河口・沿岸域は海水浴等のレクリエーションエリアとしての役割を果たす反面、下水処理水や生活排水等で病原性微生物による汚染を受ける可能性が高い場所である。日本では水浴場が具備すべき病原性微生物の基準として「糞便性大腸菌群数 1000 個/100mL 以下」が設定されている。塩素消毒後、放流された細菌は不活化状態であると考えられているが、塩素消毒後の細菌の河川中での再活性化については知見が少ない。そこで我々は、塩素消毒後、放流された細菌が塩濃度変化を受けることを想定し、塩濃度変化が細菌の不活性化や再活性化に与える影響を検討した。

【方法】次亜塩素酸ナトリウムを希釈した塩素水と大腸菌の懸濁液を接触させ、塩素消毒を行った。その後、塩素消毒後の大腸菌懸濁液に塩濃度 (NaCl) 変化を与えた。塩濃度変化は初期の塩濃度 0% に対して、0% (変化なし)、0.8%、1.5%、3.0% になるようにそれぞれ調整し、36°C に 24 時間静置した。塩素消毒の前後と、塩濃度変化から 24 時間経過後の大腸菌懸濁液に対し、コロニーカウントによる生菌数測定と、DAPI 染色を用いた全菌数測定を行った。

【結果と考察】塩素消毒後の大腸菌は生菌数が減少した。しかし、塩素消毒後の大腸菌に、0% から 0.8% の塩濃度変化と 0% から 1.5% の塩濃度変化を与えた場合、塩素消毒直後に比べて生菌数が増加した。逆に塩素消毒なしの大腸菌に、同様の塩濃度変化を与えた場合、生菌数は減少する傾向にあった。このことから、塩素消毒により不活化された大腸菌は、0% から 0.8% ~ 1.5% の塩濃度変化を与えられた場合、再活性化する可能性が示された。また、生菌数が増加した時の全菌数は、塩素消毒前と塩素消毒直後の全菌数と比較してもほとんど変化がなかった。このことから、生菌数の増加は細胞の増殖ではなく、再活性化であると考えられる。

本研究の結果、塩素消毒後の大腸菌は塩濃度変化にさらされることで生菌数が増加した。特に、汽水域程度の塩濃度変化にさらされた場合の生菌数の増加が大きかったことから、汽水域などの感潮域では細菌の再活性化が起こる可能性があるといえる。

P2-16

環境由来の微生物群集からの薬剤耐性プラスミドの取得とその解析

○森 光矢¹, 早川 雅也¹, 中道 孝一郎², 前島 由明¹, 仲田 裕貴¹, 森内 良太³, 道羅 英夫³, 金原 和秀^{1,2}, 新谷 政己^{1,2,3}

¹静岡大・院総合科技, ²静岡大・工, ³静岡大・グリーン研

E-mail: mori.mitsuya.15@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】プラスミドは細菌の細胞内で染色体とは物理的に別個に存在する自律複製可能な遺伝因子であり、同種または異種微生物間での水平伝播が可能である。また宿主の形質はプラスミドがもたらす遺伝情報により大きく変化するため、プラスミドは微生物の進化・環境適応に深く寄与している。このような性質から、プラスミドは分子生物学の必須ツールとして用いられるとともに、深刻な院内感染を引き起こす多剤耐性菌の出現と蔓延の一端を担っている。同時に、これまでに多くのプラスミドが取得されているが、環境中の微生物群集内で遺伝子の水平伝播を担うプラスミドの実態については不明な点が多い。従って、こうした微生物群集内で薬剤耐性遺伝子を運ぶプラスミドを特定することは微生物生態系の成り立ちを理解する上でも、多剤耐性菌の出現・蔓延を防ぐ上でも重要である。そこで本研究では、環境試料内における自己伝達性の薬剤耐性プラスミドについて取得を試みることにした。

【方法・結果・考察】環境中で実際に伝播するプラスミドの収集を、プラスミド上の薬剤耐性遺伝子がもたらす耐性能や、プラスミド自体の自己伝達能を指標として行った。その結果、2種類の薬剤耐性プラスミド、pSN0726-36およびpMH0621-02を取得した。全塩基配列の解読結果から、pSN0726-36はIncP-9群、pMH0621-02はIncP-1群に属することが判明した。また、pSN0726-36は、テトラサイクリンなどの抗生物質耐性遺伝子を内部に含むclass 1 integronや、ストレプトマイシン耐性遺伝子を内部に含むトランスポゾンTn5393を有し、pMH0621-02は、抗生物質耐性菌の蔓延に関与するとされるTn21とよく似たトランスポゾンを有するなど、それぞれ特徴的な遺伝子配列を有していることも判明した。そして、抗生物質のうち、グラム陰性の多剤耐性菌に対する「最後の切り札」とされたコリスチンに対する耐性を指標としてプラスミド収集を行った。その結果、コリスチン耐性プラスミドを保持すると推定される接合完了体20株を得ることに成功した。現在は、これらの菌株のもつプラスミドについて、プラスミド群の同定など詳細な解析を進めている。

P2-17

複合微生物系で実際に伝播するPromA群プラスミドの取得と解析

○早川 雅也¹, 金子 健成², 山本 雪絵², 前島 由明¹, 森内 良太³, 道羅 英夫³, 金原 和秀^{1,2}, 新谷 政己^{1,2,3}

¹静岡大・院総合科技, ²静岡大・工, ³静岡大・グリーン研

E-mail: hayakawa.masaya.15@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】プラスミドは、染色体とは独立して存在する、自立複製可能な遺伝因子である。また、プラスミドはそれを保持する微生物から保持しない微生物に接合伝達を介して移動し、抗生物質耐性遺伝子など様々な遺伝子群を運ぶことで宿主の形質を劇的に変化させることができる。そのため、プラスミドの伝播は微生物の環境への適応を促す要因の一つとして知られている。このことから、微生物の進化の機構を解明するためには、複合微生物系でどのプラスミドが実際に遺伝子の水平伝播を担うのか、またそれらはどこに存在しているのかという情報が重要である。しかし、これまでに多くのプラスミドが取得されているが、複合微生物系におけるプラスミドの動態は未だに不明のままである。そこで本研究では、プラスミドの接合伝達能を指標とすることで、全国各地の環境試料から自己伝達性プラスミド（それ自体のみで伝達可能）の収集を行い、実際の複合微生物系で伝播するプラスミドの特定を試みた。

【方法・結果・考察】プラスミドの自己伝達能を指標とした三親接合を用い、土壌、河川・湖沼底泥から合計458株の自己伝達性プラスミドを有すると推定された接合完了体の取得に成功した。それらのうち213株から抽出した全DNAに対し、既知のプラスミドの遺伝子配列を基に作製したプライマーセットを用いたPCR解析を行い、プラスミドグループの特定を試みたところ、66株がIncP-1群、94株がPromA群プラスミドを有すると推定された。この結果を受け、2本のPromA群プラスミドの全塩基配列を決定したところ、これらは抗生物質耐性遺伝子や物質代謝能などのアクセサリ遺伝子を持っていなかった。また、このような性質は、全塩基配列が決定されている全15本のPromA群プラスミドのうち、我々の先行研究で取得された5本と合わせた7本（全長が38～42 kb）についても同様に認められた。こうした結果は、得られたPromA群プラスミドが、それ自体が伝播するよりも、アクセサリ遺伝子を持つ別の可動性プラスミド（それ自体だけでは伝達不可能だが自己伝達性プラスミドの存在下で伝達可能）を伝播させる機能に優れ、自然界における遺伝子の伝播に寄与していることを示唆している。現在、PromA群と推定された他の3本のプラスミドと不和合性群が特定できなかった1本のプラスミドについて全塩基配列の解読を進めている。

P2-18

同一不和合性群に属するプラスミドであってもその宿主域は異なる

○徳田 真穂¹, 柳谷 洸輔¹, 井上 謙吾², 雪 真弘³, 大熊 盛也³, 金原 和秀¹, 新谷 政己^{1,3,4}

¹静大・工, ²宮崎大・農, ³理研・BRC-JCM, ⁴静大・グリーン研

【背景・目的】環境中に広く分布することが予測されている, 不和合性群PromAに属する2つのプラスミド pSN1104-11 と pSN0729-62 は同一細胞内で共存できない (不和合性). しかし双方のGC含量が10%異なる (1). 同様にIncP-1群に属するとされるプラスミド pBP136 と pDS1 においてもGC含量が18%異なる. プラスミドのGC含量は宿主染色体のGC含量よりも低く, その違いは10%以内であることが多い (2). 従って, 上記のプラスミドの宿主域は互いに異なることが推察された. そこで本研究では, これら同一不和合性群に属するプラスミドの宿主域の比較を行うこととした. 【方法・結果・考察】 pSN1104-11 と pSN0729-62 をもつ *Pseudomonas putida* SMDBS株を供与菌, 牛糞堆肥や土壌サンプルを受容菌群として接合実験を行った. GFP 遺伝子が供与菌内では発現しない仕組みを利用し, GFP による蛍光を呈する接合完了体のみをセルソーターを用いて収集した. 取得した接合完了体は16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて, 属レベルの同定を行った. その結果, pSN1104-11 をもつ17属と pSN0729-62 をもつ15属の接合完了体を取得し, そのうち8属, 6属は各プラスミドに特有の属であった. さらに, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* に属する細菌においては, pSN1104-11 が接合伝達した4属のGC含量はすべて60%以上であるのに対し, pSN0729-62 が伝達した2属のGC含量は共に60%以下であった. 以上の結果から, 同じ不和合性群に属するにも関わらず, 塩基組成の違いによって宿主域が異なり, プラスミドと宿主染色体のGC含量に相関があることが示唆された. 現在は, pBP136 と pDS1 の宿主域の比較を行っている. 同時に, 宿主域の違いが塩基組成によるものであるかを検証するため, 同じPromA群に属し, 61%のGC含量をもつ pMH0613-68 の宿主域の調査を行っている. (1) Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.(2) Shintani & Suzuki, 2019, Shintani M., Suzuki H. (2019) Plasmids and Their Hosts. In: Nishida H., Oshima T. (eds) DNA Traffic in the Environment. Springer, Singapore

P2-19

好熱性古細菌における酸化損傷塩基に起因する自然突然変異の修復機構に関する解析

○和田 浩樹, 久留主 泰朗

茨城大院農

我々は、細胞内変異原性物質である異常塩基の生成・分解・除去による自然突然変異修復機構に着目して研究を行ってきた。異常塩基が生成する一つの要因として塩基の酸化損傷がある。酸化損傷は細胞内での酸化ラジカル反応により行われ、最も主要な異常塩基である8-hydroxy-guanine (8-OHG) はDNA中のguanineの酸化、dGTPが酸化されて生成した8-hydroxy-deoxyguanosin-5'-triphosphate (8-OHdGTP) が複製の際にDNA中に取り込まれることで、G:C→T:AあるいはA:T→C:Gの塩基置換を引き起こす。酵素MutTは細胞質中の異常塩基8-OHdGTPを分解することで自然突然変異を抑制している。酵素MutMは、DNA中の8-OHGを除去、酵素MutYはadenineと8-OHGの誤対合を認識し、adenineの除去修復を行う。酸化損傷塩基の除去・修復に関する研究は、これまで大腸菌や枯草菌などの真正細菌、酵母などの真核生物を対象とされてきた。しかしながら、全生物最終共通祖先に最も近いとされる古細菌を対象とした研究の報告は少ない。本研究では、古細菌における酸化損傷塩基の分解・除去に関する修復機構について明らかにすることを目的とした。好熱性古細菌として全ゲノムが解読されている、*Sulfolobus tokodaii* strain 7 と *Pyrococcus furiosus* JCM 8422, *Thermococcus kodakarensis* JCM 12380 を用いた。3菌株の中で、大腸菌MutTとアミノ酸配列相同性を示す遺伝子を探索したところ、*S. tokodaii*からは3個見出されたが、大腸菌MutTとの相同性はいずれも約30%以下であった。*P. furiosus* および *T. kodakarensis* もまた同様の結果であった。*S. tokodaii* から見出した最も相同性の高い遺伝子を大腸菌内で高発現させ、酵素解析を行ったところ、大腸菌MutTと比較して基質特異性が低く、8-OHdGTP以外のヌクレオチドとも反応を示した。同様に、*P. furiosus* と *T. kodakarensis* 由来の最も相同性の高いタンパク質も8-OHdGTPの分解活性が確認された。一方、3菌株において大腸菌MutM、MutYと相同性を示す遺伝子は確認できなかった。以上のことから、古細菌における酸化損傷塩基に起因する自然突然変異の修復について考察する。

P2-20

超並列シーケンスを用いたメタゲノム解析による黄砂に含まれる細菌の群集構造解析

○藤田 達之¹, 牧 輝弥¹, 松葉 悠真², 大川 雄輝¹, 作田 裕也², 甲斐 憲次³, 河合 慶², 眞塩 麻彩実¹, 長谷川 浩¹, 岩坂 泰信⁴

¹金沢大, ²名古屋大, ³茨城大, ⁴環境創造センター

E-mail: h.y.azarea.yukitoki@gmail.com

中国大陸砂漠地帯から日本列島に飛来する黄砂は微生物を運搬し、そのヒト健康や生態系への影響が懸念される。従って、黄砂に付随する微生物の群集構造を解析し、環境への影響力が強い微生物を特定することは社会的要請の高い課題となっている。これまで、黄砂が飛来した中国や韓国において、大気浮遊細菌の細胞密度と多様性が増え、風下への細菌の風送拡散が実証されてきた。しかしながら、飛来地と発生地で細菌群集構造を比較した研究例はほとんどない。そこで本研究では、黄砂発生地であるツォクトーボー（モンゴル）と飛来地である金沢において大気粒子を採取し、粒子に含まれる細菌の群集構造を、両観測サイトで比較することで、黄砂による大気浮遊細菌の風送拡散プロセスを考察した。黄砂飛来時期である2018年4月から5月にかけて黄砂飛来地（金沢）および黄砂発生地（モンゴル、ツォクトーボー）の地上において、孔径0.2 μmポリカーボネートフィルター上に大気粒子を捕集し、計47試料を得た。DAPI染色を用いた蛍光顕微鏡観察とOPC（大気粒子濃度を粒子径別に測る測器）測定によって粒子濃度を定量し、後方流跡線解析（気塊起源を解析する手法）によって気塊の起源を推定した。細菌群集構造を解析するためフィルター上のゲノムDNAを直接抽出し、16S rRNA 遺伝子のV4領域をPCR法によって増幅した後、超並列シーケンサー MiSeq を使い核酸塩基配列を決定した。決定した配列を使い、Qiimeを用いて、門/綱レベルでの細菌の群集構造を解析した。発生地および飛来地地上では、黄砂（砂塵）発生時の試料中のOTUsは非黄砂発生時の試料に比べてそれぞれ4.2および1.3倍に高くなり、細菌群の多様性も非黄砂試料より高い値となった。また、黄砂試料と非黄砂試料の細菌の群集構造を比較すると、黄砂試料中において、飛来地ではActinobacteriaおよびBacilliの土壌細菌群が高くなったのに対し、発生地では減少あるいは維持であった。発生地では、砂塵とともに植物や糞便、土壌に由来する細菌種が一挙に巻き上がり、黄砂飛来地では長距離輸送される際に、ストレス耐性のある土壌細菌が残ったと考えられる。PCoA解析では、発生地と飛来地共に黄砂試料と非黄砂試料は異なるクラスターを形成した。よって、中国大陸から黄砂と共に特定の土壌細菌群が流入し、黄砂飛来地である日本の大気中の微生物群集が変化することが示唆された。

P2-21

環境細菌におけるadhX遺伝子が関与する貧栄養環境適応機構の普遍性

○酒井 洋範, 加藤 広海, 大坪 嘉行, 津田 雅孝, 永田 裕二

東北大・院生命科

【背景・目的】従属栄養細菌にとって自然環境の多くは栄養飢餓状態であり、細菌の当該環境への適応機構として増殖を制限し「耐え忍ぶ」機構が広く知られている。一方で、栄養源が限られた環境下でも増殖する機構を有する従属栄養細菌の存在も見出されており、我々は、好気性従属栄養細菌でAlphaproteobacteriaに属する *Sphingobium japonicum* UT26株が、alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現により、有機炭素源非添加の無機塩培地にて二酸化炭素固定を伴い生育する現象 (oligotrophic growth (OG) 表現型) を見出し、その機構解明を進めている。本研究では、*adhX*関与のOG表現型の普遍性を検討した。

【方法・結果および考察】細菌におけるAdhXホモログ遺伝子の分布を検討した。UT26株由来の*adhX*と99%以上のidentityを示すほぼ同一の遺伝子が複数のsphingomonads近縁株で見出され、これらの多くはプラスミド上に存在することから、近縁株間での水平伝播の可能性が示唆された。更に、60%以上のidentityを示すものはBetaproteobacteriaやGammaproteobacteriaに属するグラム陰性細菌にも広く保存されていた。これら多様なAdhXホモログ遺伝子の中から、identityのレベルが異なる6種類の遺伝子を発現ベクターを用いてUT26株由来の*adhX*遺伝子欠失株に導入したところ、ほぼidentityの程度と相関してOG表現型を示し、sphingomonads細菌群以外の細菌株由来のAdhXホモログ遺伝子もOG表現型に寄与し得ることが示された。逆にUT26株由来の*adhX*を高発現させるとOG表現型を示すBetaproteobacteria株の存在も見出しており、*adhX*関与のOG表現型はある程度普遍的な現象であると考えられる。一方、同レベルのidentityでもOG表現型に顕著な差がみられる場合もあった。今後、これらAdhXホモログのアミノ酸配列や酵素的性質とOG表現型との関係性を明らかにすることで、OG表現型の機構解明に繋がる知見が得られると期待できる。

P2-22

大腸菌コロニー形成パターンの解析

○Heng Xue, Beiwen Ying

筑波大・生命環境

E-mail: s1830194@s.tsukuba.ac.jp

自然界に生息する微生物の特有の形態として、多様なコロニーが形成されている。また、実験室条件下においても微生物のコロニー形成が均一でないことがよく観察されている。このようなコロニーの形成や分布に関する研究がほとんどなされていないため、コロニー間のばらつきが何を表しているのか、そのばらつきが何に由来するのかが不明である。本研究はコロニー形成パターンから微生物の集団増殖を理解するため、モデル微生物の大腸菌を用い、実験室条件下でのコロニー形成パターンを解析する。大腸菌野生株 W3110 を含むゲノム長さや変異の異なる複数遺伝子型を対象に、LB 寒天培地上でのコロニー形成に対する空間分布解析を行った。各大腸菌のコロニー形成の時系列変化を観測し、新規に開発した自動計測プログラムによって、コロニーの数や大きさ (ピクセル) などの情報を定量的に評価した。その結果、同一遺伝子型におけるコロニー間のばらつきが確認され、そのばらつきが遺伝子型 (菌株) によって異なることがわかった。そして、ポロノイ図をコロニーの空間分布の解析に適用し、コロニー間の空間面積を表すポロノイ領域を評価した。その結果、コロニーの大きさとそのポロノイ領域の面積の間には有意な正の相関が見られた。この相関が遺伝子型に依存するかについて本学会で報告する。

P2-23

クオラムクエンチング作用を有する酵素の添加が *Aeromonas caviae* のバイオフィーム形成に及ぼす影響

○細江 彩華¹, 飯泉 太郎², 田中 愛里², 永井 直宏², 細見 正明¹, 寺田 昭彦¹

¹東京農工大・院工, ²栗田工業

目的 冷却水系におけるバイオフィアリングは、熱交換効率の低下等を引き起こし、工場の安定操業に影響を及ぼす恐れがある。対策として抗菌剤等による処理が行われているが、薬剤排出による環境影響が懸念されている。細菌にはシグナル物質を用いて近傍の細菌密度を感知し、細菌密度が閾値を超えると一斉に特定遺伝子を発現するクオラムセンシング (QS) 機構を持つ種類が存在し、このような細菌によりバイオフィーム形成が促進される。QS によるバイオフィーム形成抑制のため、細菌細胞間のシグナル伝達を遮断することで QS を阻害するクオラムクエンチング (QQ) を利用した技術が開発されている。本研究では、QQ を行う細菌 (QQ 細菌) を用いて冷却水系のバイオフィアリング抑制を目指した。まず、冷却水系から単離された、QS 阻害物質としてラクトナーゼを分泌する *Sphingopyxis* sp. EG6 株由来の精製ラクトナーゼを獲得し、これが他の細菌のバイオフィーム形成量に及ぼす影響を調査した。

方法 *S. sp. EG6* 株のラクトナーゼ生成遺伝子を導入して作製した組換え大腸菌から精製ラクトナーゼを得た。比較のためにブタ腎臓由来のアシラーゼ I と、これをオートクレーブ滅菌して酵素活性を失活させたものを用意した。これらを *N*-アシル-L-ホモセリンラクトン (AHLs) を用いて QS を行う *Aeromonas caviae* に終濃度 5 mg/L となるように添加して 96 ウェルプレートで培養した。培養 4, 7, 20, 48 時間後に形成されたバイオフィームを 0.1% クリスタルバイオレット (CV) 水溶液で染色し、CV が A₅₉₀ に吸収を持つ性質を利用してバイオフィーム形成量を定量した。

結果 ラクトナーゼ及びアシラーゼによって *A. caviae* の培養初期のバイオフィーム形成量が減少した。効果は培養 4 時間後に最大となり、酵素非添加系と比較してラクトナーゼによって 40%、アシラーゼによって 19% バイオフィーム形成量が減少したが、培養時間が長いほど抑制効果が低くなり、48 時間後にはバイオフィーム形成抑制効果が見られなくなった。

結論 冷却水系から単離された *S. sp. EG6* 株由来の精製ラクトナーゼ及びブタ腎臓由来のアシラーゼによって、AHLs を用いて QS を行う *A. caviae* の培養初期のバイオフィーム形成抑制が確認された。今後はフローセルを用いて基質を連続通水し、酵素がバイオフィーム形成量や構造に及ぼす影響を調査する。

謝辞 本研究の実験アドバイスを頂きました宇都宮大学の諸星知広准教授に厚くお礼申し上げます。

P2-24

普遍的リボヌクレアーゼを介した大腸菌バイオフィーム形成の分子機構

○南 篤¹, 日高 真誠^{1,2}, 葛山 智久^{1,2}, 小川 哲弘^{1,2}

¹東大院・農生科・応生工, ²CRIM

RNase T2は、一本鎖RNAを非特異的に分解するリボヌクレアーゼである。これはゲノムが解読されたほぼすべての生物に存在し、多様かつ重要な生命現象に関わる。これまで、ヒトや植物、酵母などでは研究が進んでいたが、バクテリアにおける機能はほとんど明らかにされていなかった。最近、大腸菌のRNase T2 (RNase I) がバイオフィーム形成を制御することが報告された。大腸菌実験室株はバイオフィームをほとんど形成しないが、RNase Iの遺伝子を破壊するとバイオフィームを形成できるようになる。このメカニズムとして、RNase Iによる宿主RNAの分解産物である2',3'-環状ヌクレオチドリン酸が、バイオフィーム形成を抑制する新規セカンドメッセンジャーとして機能することが示された。通常、RNase Iはペリプラズムに局在することから、細胞質に流入したRNase Iが宿主RNAを分解すると考えられる。一方で、細胞質リボソーム (16S-rRNA helix 41) がRNase Iの活性を阻害することも報告されている。このことから、何らかのタイミングでリボソームによる阻害が解除される必要があると考えられるが、そのメカニズムは不明であった。そこで本研究では、リボソームによるRNase I活性調節機構を明らかにし、バイオフィーム形成の新たな制御機構を提示することを目的とした。ストレスへの暴露や、定常期まで培養を行うと、構造変化により翻訳活性を停止したりリボソームが蓄積する。こうしたリボソームの構造変化により、RNase Iの活性が阻害されるようになると考えた。この構造変化を起こしたりリボソームを細胞内に蓄積しやすい変異株に対してアミノ酸飢餓を誘導し、この時のバイオフィーム形成能を野生株のものと比較した。その結果、全ての破壊株で、バイオフィーム形成能が有意に上昇した。このことから、この構造が変化したリボソームが、RNase Iの活性を阻害することが示唆された。

P2-25

植物病原菌*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* における Quorum Sensing の多様性解析

○小笠原 祐斗¹, 謝 肖男², 濱本 宏³, 染谷 信孝⁴, 諸星 知広¹

¹宇大院・工, ²宇大・バイオ, ³法政大・植医, ⁴農研機構・野菜花き

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (Pcc) は、様々な農作物に感染する軟腐病の原因菌として知られている。多くのグラム陰性植物病原菌では、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質とした細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing により、病原性因子の発現が制御される例が多数報告されており、Pccにおいては、ペクチナーゼなどの主要な病原性因子の発現がAHLを介したQuorum Sensingにより制御される。過去の報告により、Pccは主要なAHLとして3-oxo-C6-HSLまたは3-oxo-C8-HSLを生産する2つのグループが存在することが明らかになっているが、その分布や多様性は解析されていない。本研究では、カルチャーコレクションに保存されているPcc菌株を用い、AHL生産グループおよびAHL合成酵素 (ExpI) 配列の多様性を明らかにすることを目的とした。農業生物資源ジーンバンク及びNBRCに保管されている282株のPccを用い、培養上清から抽出したAHLの構造をLC-MS/MSにより解析したところ、3-oxo-C8-HSLを主に生産するクラス (QS class I) が212株、3-oxo-C6-HSLを主に生産するクラス (QS class II) が70株存在していた。さらに、QS class IIの中には、一定濃度の3-oxo-C6-HSLを生産するクラス (QS class II-1) と、ごく微量の3-oxo-C6-HSLのみ生産するクラス (QS class II-2) の2つのサブクラスが存在していた。次に、全ての菌株からExpIのアミノ酸配列取得したところ、75%の配列同一性でQS class IとIIを完全に分類することが可能であった。また、expI遺伝子を大腸菌に導入したところ、QS class II-1と比べてQS class II-2のexpIを導入した大腸菌は3-oxo-C6-HSL生産量が大幅に低下していたことから、この活性の低下はわずかなアミノ酸配列の違いに由来するものと推察された。

P2-26

BT 剤による植物病原菌の Quorum Sensing 阻害効果

○野呂 文峻¹, 染谷 信孝², 諸星 知広¹

¹宇大・院工, ²農研機構・野菜花き

BT 剤は、*Bacillus thuringiensis* を主成分とする生物農薬であり、*B. thuringiensis* が生産する結晶性殺虫タンパク質により、鱗翅目幼虫による食害を防除することが可能である。植物病原性グラム陰性細菌の多くは、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質とした Quorum Sensing により、病原性に関連する様々な遺伝子発現を制御することが報告されている。これらの病原菌の Quorum Sensing を阻害すると、病原性発現の抑制が可能なることから、Quorum Sensing 阻害は新しい植物病防除技術への応用が期待されている。*B. thuringiensis* が属する *B. cereus* グループの多くは、AHL を加水分解する AHL ラクトナーゼ活性を有しており、AHL 分解により植物病原菌の病原性抑制が可能である。本研究では、市販の BT 剤由来菌株とカルチャーコレクション (NBRC、JCM) 由来 *B. thuringiensis* を用い、AHL 分解活性及び Quorum Sensing 阻害効果を検証した。試験菌株を AHL を添加した培地に接種して培養後、上清の残存 AHL を AHL レポーター株を用いて検出したところ、すべての株で AHL の応答が消失していたことから、AHL 分解活性を有することが明らかとなった。次に、既知の *B. cereus* 由来 AHL ラクトナーゼ遺伝子 (*aiiA*) の配列を基にしたプライマーを設計し、試験菌株から *aiiA* を PCR で増幅したところ、すべての菌株から *aiiA* が増幅し、アミノ酸配列を基にした系統解析から 4 つのグループに分類された。また、*aiiA* をクローニングして大腸菌に導入し、AHL 分解活性を調べたところ、すべての *aiiA* を導入した大腸菌が AHL 分解活性を示したことから、実際に AHL ラクトナーゼとして機能することが明らかになった。

P2-27

植物病原菌 *Pseudomonas syringae* における Quorum Sensing の多様性解析

○大嶋 旭昇¹, 謝 肖男², 染谷 信孝³, 諸星 知広¹

¹宇大院・地域創生, ²宇大・バイオ, ³農研機構・野菜花き

植物病原性グラム陰性細菌の多くは、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質とした Quorum Sensing により、病原性に関連する様々な遺伝子発現を制御することが報告されている。Quorum Sensing を阻害すると、病原性発現を効果的に抑制することが可能であることから、Quorum Sensing 阻害は新しい植物病防除技術への応用が期待されている。斑点症状を引き起こすことで知られる植物病原菌 *Pseudomonas syringae* は、様々な病原型が存在するなど分類上も多種多様であるため、微生物カルチャーコレクションに登録された膨大な *P. syringae* 菌株における Quorum Sensing 機構の全体像は明らかになっていない。本研究では、カルチャーコレクションに保管されている日本国内で分離された *P. syringae* に着目し、AHL 生産を伴う Quorum Sensing の多様性を明らかにすることを目的とした。まず、農業生物資源ジーンバンクに保管されている *P. syringae* の中から、主に野菜類に対する病原菌として登録されている 91 株を選択し、AHL レポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株及び VIR07 株とクロスストリークさせることにより AHL 生産を調査した。その結果、病原型が *pv. lachrymans*, *pv. mellea*, *pv. tabaci* に分類される 51 株が明確な AHL 生産を示すことが明らかになり、LC-MS/MS 解析を行ったところ、すべての株で C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL が 90% 以上の割合を占めることが明らかになった。次に、すべての株において AHL 合成遺伝子 (*psyl*) の存在を特異的プライマーで調査したところ、AHL 生産を示す 51 株に加えて、AHL 生産を示さない *pv. maculicola*, *pv. solidagae*, *pv. tomato* に分類される 29 株も AHL 合成遺伝子を有していたことから、これらの菌株では AHL 合成遺伝子が発現しないか、AHL 生合成活性が欠損している可能性が示唆された。

P2-28

亜酸化窒素還元能を持つ硝化細菌*Nitrobacter*の発見

○高橋 悠¹, 藤谷 拓嗣², 末永 俊和³, 寺田 昭彦³, 廣野 祐平⁴, 多胡 香奈子⁵, 早津 雅仁⁵, 常田 聡¹

¹早大院・生医, ²産総研・バイオメディカル研究部門, ³農工大・応用化学, ⁴農研機構・果樹茶業研究部門, ⁵農研機構・農環研
E-mail: SpinningTop02765@ruri.waseda.jp

<背景>茶園土壌には大量の窒素がアンモニアとして施肥されるが、硝化により土壌から溶脱しやすい亜硝酸、硝酸に変換され、窒素の50%程は作物に吸収されずに経済的損失や地下水汚染を引き起こす。また硝化反応の副生成物として、高い温室効果やオゾン層の破壊をもたらす亜酸化窒素(N₂O)が発生する。これを除去する唯一の経路は脱窒細菌によるN₂O還元であるが、茶園土壌のような低pH環境ではN₂O発生量が多く、この還元反応の活性は低いと推測されている。そのため茶園土壌における硝化はN₂Oの発生経路として問題視されている。本研究では、茶園土壌から分離した亜硝酸酸化細菌のゲノムを解読し、N₂O還元能を持つ世界初の硝化細菌であることを明らかにした。

<方法>茶園土壌をサンプル源とし、本研究室で開発した混合型連続培養槽を用いて亜硝酸を供給して培養した。増殖した*Nitrobacter*が凝集体を形成することを利用して、形態に基づく選択的なセルソーティングによって凝集体を分取し、分離株NbASを樹立した。次世代シーケンサーでNbASのゲノム配列を取得し、データベースに公開されている*Nitrobacter*の6個のホールゲノムシーケンスと比較すると、NbASに固有の遺伝子としてN₂O還元酵素遺伝子*nosZ*が同定された。この*NosZ*のアミノ酸配列を脱窒細菌の保有するホモログと比較し、系統を解析した。NbASによるN₂O還元能を確認するため、N₂Oを溶解させた水を添加し、溶存N₂Oの濃度変化を微小電極で測定した。

<結果・考察>NbASのゲノム配列は既存株*Nitrobacter vulgaris* Ab1と非常に相同性が高く、Average Nucleotide Identityは96%であった。一方で*nosZ*を含むコンティグは他のどの*Nitrobacter*とも相同ではなかった。*NosZ*のアミノ酸配列に基づく系統解析の結果、NbASはclade I typeに属し、最も近縁なのは同じく*Rhizobiales*目に分類される*Bradyrhizobium*属であった。この結果は「*nosZ*の系統樹は微生物の進化系統に対応する」という既往研究の報告と一致した。ただし*Bradyrhizobium*属と異なり、NbASは一酸化窒素還元酵素遺伝子(*nor*)を欠損していた。無機嫌気環境下の試験で、NbASのN₂O還元活性が示された。

P2-29

土壌の複雑な微環境における土壌細菌群集構造のマイクロレベル解析

○高山 清一郎¹, 和穎 朗太², 荒井 見和², 濱村 奈津子³

¹九大・院・システム生命科学, ²国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, ³九州大学理学研究院

土壌は、ナノ-ミリメートルレベルの様々なサイズと化学組成を有する鉱物粒子と有機物の相互作用によって形成された団粒構造を持ち、地球上で最も多様な微生物生態系を育むマイクロ環境である。微生物は土壌構造中で不均一に分布しており、特にマイクロメートルレベルの団粒では、バイオマスが局在化し高い代謝活性を示す一方で長期的に貯留する炭素の大半が存在することも報告されている。加えて、農地などの土壌においては耕作や肥料条件等の栽培管理により、多様な系統の微生物が刺激を受け群集構造や機能が変化するという報告もある。本研究では、土壌の物理構造と物質循環を駆動する微生物群集の相互関係を明らかにするため、土壌の機能ユニットである団粒サイズと栽培管理に着目し、栽培条件と団粒サイズの構成割合が大きく異なる農地から採取した土壌の細菌群集構造の比較解析を実施した。土壌サンプルは農研機構・農業環境変動研究センター(茨城県つくば市)の圃場の不耕起・落葉堆肥区および耕起・化学肥料区2種の黒ボク土(pH 6.2)を用いた。不耕起土壌では落葉堆肥が投入されており、耕起および化学肥料の施肥が行われてきた対照区に比べて、約2倍の全炭素濃度と全窒素濃度であること、団粒構造が発達していることが先行研究により明らかにされている。これら2つの処理区の土壌を湿式篩別法により4つの団粒サイズ(> 1 mm, 0.25-1 mm, 0.053-0.25 mm, < 0.053 mm; それぞれn=3)に分画し、DNA抽出後16S rRNA遺伝子のV1-V3領域をNGSにより配列解読を行った。その結果、不耕起土壌は対照区よりも高いα多様性を示し、細菌群集構造のUniFrac解析では、不耕起土壌と対照区の細菌群集構造は団粒サイズに関わらず異なっていた。団粒サイズごとの比較では、両処理区において< 0.053 mmサイズで他の3つのサイズと顕著に異なる群集構造が形成されており、対照区では特に団粒サイズ間で群集のバラツキが増大する傾向が見られた。これらの結果は、栽培処理条件や< 0.053 mmサイズにおける微生物群集の機能性の違いを示唆しており、今後さらに団粒や栽培処理の物理化学特性と微生物活性の評価が望まれる。

P2-30

日本の森林における土壤微生物群集の物質代謝機能 -メタゲノムと生物地理-

○伊澤 航太郎¹, 伊勢 裕太¹, 高見 英人², 大手 信人³, 妹尾 啓史¹, 磯部 一夫¹

¹東京大, ²JAMSTEC, ³京都大

E-mail: kotaro.hanaserebu@gmail.com

森林土壌において微生物は有機物の分解、物質循環の形成、植物への養分供給、炭素や窒素の貯蔵などの機能を担い、生態系を支えている。日本は森林が国土の約70%（天然林が約40%、人工林が約30%）を占め、気候に応じて北から南まで植生は大きく異なる。森林の物質循環はたとえ隣り合った森林間でも異なる。このような差異はどのようにして生まれるのだろうか。本研究では、物質循環過程の多くが土壤微生物の物質代謝であることに立脚して、土壤微生物群集が有する物質代謝機能の観点から、森林間における物質循環の差異の理解を試みる。

日本の北海道から沖縄まで全国40地点（天然林と人工林がそれぞれ約半数ずつ）から土壌を採取し、HiSeqを用いて土壤微生物群集のメタゲノムの配列決定を行った。MAPLE2.3.1 (metabolic and physiological potential evaluator) を用いて、メタゲノム配列から土壤微生物群集の物質代謝機能を推定した。その他、森林環境データ、土壌環境データ、窒素循環（窒素無機化、硝化）速度を測定した。

物質代謝機能（MAPLEに基づく機能モジュール）の構成は、土壌の酸性度が異なる森林間で明確に異なった。天然林と人工林の間、あるいは土壌分類が異なる森林間で差異は見られなかった。北海道、本州、四国、九州と沖縄で構成は異なっていたが、その差異は小さかった。特に、中性土壌の森林では酸性土壌の森林と比較して、窒素代謝のほか、無機・有機イオン、糖、脂質、リン酸、アミノ酸、金属カチオン等の輸送を担うトランスポーターに関するモジュールが多く検出された。一方、酸性土壌の森林では、酸性環境や浸透圧といった外部環境やストレスに対する応答に関するモジュールが多く検出された。

以上のことから、土壤微生物群集が有する物質代謝機能にはストレス応答と養分吸収・エネルギー生成の間に負の相関関係があり、それにより土壌の酸性度が群集の物質代謝機能を制御していることが示唆された。現在、群集の物質代謝機能の差異が窒素循環速度にもたらす影響について検証している。

P2-31

干潟土壌中での複合有機物分解と発電に関与する微生物の同定

○猪鼻 淑乃, 勝矢 祥平, 高妻 篤史, 渡邊 一哉

東葉大院・生命

【目的】

近年、外界と電気的相互作用する能力を持つ微生物が注目を集めている。これらは電気化学活性菌 (electrochemically active bacteria, EAB) と呼ばれ、基質となる有機物が存在するときそれらを酸化分解して発生する電子を細胞外の電極などの導電性物質に放出して発電することができる。今までの研究において、EABは土壌や湖沼堆積物などから単離されている。EABを利用した発電システムは微生物燃料電池 (microbial fuel cell, MFC) と呼ばれ、バイオマス廃棄物や有機汚濁物質を分解しながら電力が回収できることから、環境分野での利用が期待されている。今までにヘドロなどが堆積した海洋底泥の浄化を目的としたMFCも検討され、一方で海洋底泥から酢酸を基質としてEABが単離された例もある。しかし、複合有機物を基質として海洋環境からEABが単離された例はなく、ヘドロ等で汚染された海洋底泥の浄化にどのようなEABが関与するか不明であった。そこで本研究では、干潟などで複合有機物が分解される際に発電に関与するEABを同定することを目的とし、東京湾沿岸の4カ所の干潟（多摩川河口、小櫃川河口、三番瀬、江戸川河口）で採取した土壌を植菌源、デンブンやペプトンからなる複合有機物を基質としてMFCを運転した。

【結果】

4つの干潟土壌のうち、小櫃川河口と江戸川河口の土壌を用いたMFCで高い出力が測定された。菌叢解析の結果、両MFCのアノードにおいてEABとして知られる *Shewanella* 属細菌が比較的多く検出され、分子系統解析では *S. algae* の近縁種と同定された。また、これらMFCのアノードには発酵細菌として知られる *Aminobacterium* 属細菌も集積されており、この細菌の代謝産物を基質として *S. algae* が発電する可能性が考えられた。そこで、電極プレート培養法を用いて小櫃川MFCのアノードから *S. algae* の近縁種を単離し、*Aminobacterium* 属細菌の主な代謝産物である酢酸などを基質として電流生成実験を行った。その結果、EABとして広く研究に用いられている *S. oneidensis* MR-1 は酢酸を基質とした電流生成できないのに対し、単離株では顕著な電流が確認された。これらの結果は、*S. algae* の近縁種は多様な基質を利用して電流を生成できること、干潟などの環境中で複合有機物を発酵分解する細菌の代謝産物を利用して発電することを示している。

P2-32

土壌細菌叢の液体培養系における遷移の動態解析

○東 豊浩, 加藤 広海, 長田 穰, 永田 裕二, 近藤 倫生
東北大・生命科学研究所

【背景と目的】近年の塩基配列解析技術の発達により、細菌群集において群集の網羅的な菌叢組成データを比較的容易に得ることが可能になった。本研究では、マクロ生物では観察の難しい群集形成の原理を探るため、高い多様性を持つ土壌細菌叢の遷移過程について継続的に観察を行った。

【方法】褐色森林土より採取した微生物集団を、同じ褐色森林土から調整した土壌抽出液を主成分として含む液体培地に添加し、30℃暗所で攪拌培養しながら、12時間ごとにサンプルを採取した。3反復で同条件の培養を行った。採取したサンプルからメタゲノムDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスにより菌叢解析を行った。また、全体の菌数について real-time PCR による 16S rRNA 遺伝子コピー数の絶対定量を行い、全 16S rRNA 遺伝子コピー数に菌叢解析で得られた各属の存在割合を乗することで擬似的な個体数データを算出した。さらに、得られたデータについて、同微生物集団を滅菌土壌に接種した場合(日本微生物生態学会前年度大会等で発表)と比較した。

【結果】菌叢解析の結果、2週間で様々な細菌属の増減が起こるなど大規模な菌叢遷移が観察された。1%以上の存在割合を示した族を優占属とし、液体培養と土壌培養で比較した結果、両培養でそれぞれ約60の優占属が検出され、その半数ほどが共通していた。中でも培養初期の *Bacilli* 綱や *Betaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門の細菌属の優占、培養後期の *Acidobacteria* 門など難培養性細菌属の増加など、変動パターンについても共通点が見出された。一方で *Bdellovibrio* 属などの細菌捕食性 *Deltaproteobacteria* 綱の中期優占など、液体培養に特徴的な変動パターンも観察された。

また、同条件下で培養した3系列とも概ね同様の菌叢遷移を辿った。実験開始初期段階ではほぼ同じ菌叢組成に速やかに収束したが、時間経過に従い、遷移の方向に系列間で差が見られるようになった。以上、初期の細菌叢の遷移が決定論的動態として理解できる可能性とともに、時間経過に伴う何らかの要因によって菌叢組成に分化が生じることが示唆された。

P2-33

Bacillales 目細菌および自活性線虫を優占化させた土壌改良資材施用効果の分子生物学的解析

○蔵下 はづき¹, 池田 匠児², 平片 悠河², 高木 素紀³, 幡本 将史², 牧 慎也², 山口 隆司², 青井 透⁴, 黒田 恭平¹

¹都城高専・物工, ²長岡技大, ³茨城県農総セ, ⁴群馬高専

E-mail: kurashitaqd@miyakonojo.kosen-ac.jp

日本では年間約61,500 tのレンコンが生産されているが、寄生性線虫 (*Hirschmanniella diversa*, *H. imamuri*) によって引き起こされる黒皮症等の病害が問題となっている。石灰窒素、太陽熱消毒等による防除が行われているが、人体への影響の懸念や労力に対する防除効果が低いことから新たな防除方法が求められている。我々は化学農業に依らない簡便・安価な防除方法として *Bacillales* 目細菌および自活性線虫を優占化させた土壌改良資材 (以下、資材とする) を開発している。本資材を施用することにより、*Bacillales* 目細菌の産生する抗生物質 (iturin 等) による寄生性線虫の防除、自活性線虫の寄生性線虫捕食等による線虫害抑制効果が期待される。本資材をレンコン栽培実圃場に施用した結果、レンコンの黒皮症被害の低減効果が確認され、資材中の *Bacillales* 目細菌および自活性線虫が線虫害抑制に関与したことが示唆された。しかし、資材中の *Bacillales* 目細菌が実圃場内で抗生物質産生能を有するか不明であること、土壌中における自活性線虫と寄生性線虫の動態を評価する方法が無いことが課題として挙げられた。本研究では、資材による寄生性線虫害の防除機構を解明することを最終目的とし、資材からの *Bacillales* 目細菌の分離培養および抗生物質産生能の評価、18S rRNA 遺伝子を対象としたレンコン栽培土壌の真核生物群集構造解析を行った。結果、資材から芽胞形成能を有する微生物 15 株の分離培養に成功した。 *Bacillus* 属特異的プライマーによる分離株の PCR 増幅を行った結果、全 15 株の遺伝子増幅が確認され、分離株は *Bacillus* 属に属する可能性が示唆された。今後、得られた分離株の抗生物質産生能の有無を評価する。レンコン栽培土壌の真核生物群集構造解析の結果、線虫門に属する系統は全体の 1-3% 程度検出され、Triplonchida 目を含む自活性線虫の系統分類群は確認された一方で、植物寄生性線虫を含む Tylenchida 目は検出されなかった。真核生物全体を対象とした群集構造解析では、系統間のゲノムサイズの違いがコミュニティの構成比に影響を及ぼす。そのため、土壌中の線虫群集構造を正當に評価するためにも、線虫門特異的な群集構造解析を行う等、新たな評価技術が必要であると考えられた。

P2-34

Energy-balance evaluation of aerobic and anaerobic wastewater treatments specially focusing microbial fuel cell

Mari Sugioka¹, ○Naoko Yoshida¹, Ken Fuji¹, Hirokazu Matsubara², Mitsuhiro Sakoda³, Yoshinori Genda³, Kazuki Iida²

¹Grad. Sch., Dept. Civil Eng., Nagoya Inst. Technol., ²Nippon Koei, ³Tamano Consultants Co., Ltd.

This study evaluated the performance of a tubular microbial fuel cell (MFC) having a core of air-chamber wrapped with an anion exchange membrane in sewage wastewater treatment. Three MFCs were vertically assembled into one module and floated in sewage water channels before and after the treatment in primary sedimentation tank. The two MFC-modules showed almost similar electricity production in the range of 1.3-5.7 Wh/m³-MFC, while the bottom MFCs (60-90 cm) showed a decrease in electricity than the top MFC (0-30 cm) and the middle MFC (30-60 cm). One of the MFC modules was then evaluated for the COD removal rate with two external resistances of 27ohm and 3ohm, in a chemostat reactor (MFC:reactor = 1:5, v/v) under three hydraulic retention times (HRTs), 3 h, 6 h, and 12 h. The best COD removal rate of the MFC (COD-RT_{MFC}) was observed with 3 ohm of resistance and 12 h of HRT, resulting in 3.8 ± 2.0 A/m³ of current recovery and 15 ± 7.5 % of Coulombic efficiency. Electricity generation efficiency (EGE_{MFC}) was the best with 27 ohm of resistance and 12 h of HRT and accounted for 0.18 ± 0.11 kWh/kg-COD with 17 ± 6.4 % of COD-RT_{MFC} and 0.65 ± 0.10 Wh/m³ electricity production. Based on the calculation using the COD-RT_{MFC} and EGE_{MFC}, wastewater treatment can reduce electricity consumption by 55% via integration of the MFC-3ohm prior to the aeration. That was advantageous in the comparison of the other anaerobic treatments with higher values of EGE, i.e. methane fermentation and MFC-27ohm.

P2-35

高圧ジェット装置を組み込んだ硝化液循環活性汚泥法による余剰汚泥排出削減と微生物群集構造の変化

○吉野 寛之¹, 堀 知行², 細見 正明¹, 寺田 昭彦¹

¹農工大・院工, ²産総研

E-mail: yhiroyuki@m2.tuat.ac.jp

活性汚泥法による排水処理では、余剰汚泥の発生が問題視されている。余剰汚泥の処理に要する費用が排水処理場の管理において大きな割合を占めることから、その削減が求められる。これまでにオゾンやアルカリによる余剰汚泥減容化技術が提案されてきたが、コストや維持管理などの課題から広く普及するには至っていない。そこで我々は、これらの課題を解決した汚泥減容化システムとして高圧ジェット装置を開発した。高圧ジェット装置は高圧ポンプと活性汚泥中の微生物細胞を破碎する配管で構成されるシンプルな構造を有し、摩擦、キャビテーション、衝突などの機構により汚泥中の微生物を破壊することが可能である。これまでパイロットスケールの標準活性汚泥法へ高圧ジェット装置を導入し、約30%の汚泥減容化を達成し、活性汚泥中の微生物群集の変遷を示してきた。本研究はパイロットスケールの硝化液循環活性汚泥法を採用したシステムの汚泥返送ラインに高圧ジェット装置を導入した実験系、従来の硝化液循環活性汚泥法である対照系を設置し、装置導入が余剰汚泥減容化性能、処理水中の懸濁物質（SS）の排出量、窒素除去性能へ及ぼす影響を評価した。また、活性汚泥のフロック構造や微生物群集構造の変化を確認することで高圧ジェット装置の有効性を明らかにした。111日間の実生活排水の連続通水試験において、実験系から排出された余剰汚泥積算量は対照系と比較して27%となった。処理水中に含まれるSSを加味した高圧ジェット装置導入による汚泥減容化率は56%であった。実験系と対照系の処理水中の有機物・窒素除去率に有意差はみられなかった。運転終了時の活性汚泥に対して、次世代シーケンサーによる16S rRNA遺伝子に基づくアンプリコン解析、FISH法を適用した。次世代シーケンサー解析の結果、実験系・対照系の活性汚泥中の微生物群集構造が大きく異なることを確認した。実験系において細胞外ポリマー物質を資化するThermomonas属の増加、糸状性細菌として知られるChloroflexi門の減少が見られた。FISH法の適用により、高圧ジェット装置の導入で活性汚泥フロックのサイズは減少しなかったものの、Chloroflexi門の相対存在率の減少を確認した。これらの変化は、高圧ジェット装置の細菌細胞の可溶化による有機炭素源の供給や、物理的衝撃に弱いと考えられる形状を有する糸状性細菌の破壊が原因であると考えられた。

P2-36

土壌カラムを用いた揮発性有機塩素化合物の浄化における細菌叢への温度影響

○鈴木 市郎^{1,2}, 田 小維², 川村 美帆¹, 東 瑤子¹, 山崎 祐二³, 奥田 信康³, 小林 剛^{2,4}¹横浜国大・院理工, ²横浜国大・リスク共生セ, ³(株) 竹中工務店, ⁴横浜国大・院環

E-mail: suzuki-ichiro-db@ynu.ac.jp

【緒言】テトラクロロエチレン (PCE)、トリクロロエチレン (TCE) などの揮発性有機塩素化合物の生物的浄化において、土壌、地下水を 30℃ 程度に加温することにより浄化の短期間化を図ることができる。加温による土壌中の細菌叢の組成への影響、また、加温や通水方法の違いによる土壌カラム内の細菌叢の分布への影響などを調べるため、土壌カラムを用いた実験を行い、土壌内の細菌叢の組成を解析した。

【方法】通水性の異なる 2 種類の土壌をそれぞれガラスカラムに充填し、*Dehalococcoides* 属を含む集積培養系を添加した。PCE, TCE, cis-ジクロロエチレン (cDCE) および電子供与体となる添加剤を含む溶液を、(1) 連続、(2) 4 日に 1 回 100 ml (半止水)、の条件で通水し、15℃、30℃ で浄化実験を行った。浄化実験終了後のカラムより土壌を採取し、細菌 DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子アンプリコンの組成を Illumina MiSeq により解析した。

【結果と考察】細菌 16S rRNA 遺伝子アンプリコンの組成を Weighted UniFrac を用いて比較した結果、土壌の違いよりも温度の違いによる細菌叢の類似度への影響が大きいことが明らかとなった。異なる土壌で通水量が同じ半止水型カラムでは同じ温度での細菌叢が類似していたが、連続通水では透水性の異なる土壌で通水量を変えたため添加された PCE 等の総量が異なり、土壌ごとの細菌叢が比較的異なっていた。従って、土壌の物性の違いよりも、加温や栄養源の添加量などの操作による細菌叢の組成への影響が大きいことが判明した。*Dehalococcoides* 属は、半止水型カラムでは入口側の割合が最大で全細菌中の 0.1% 程度存在して出口側に向けて減少していたが、連続通水型カラムでは最大 3% 程度の割合まで存在し入口よりも内部での割合が増加していたことから、おそらく通水方法の違いによりカラム内での PCE 等の濃度分布が異なり、それが各カラムでの *Dehalococcoides* の分布に反映されたと考えられた。

P2-37

脱ハロゲン化呼吸細菌の大量培養および還元的脱ハロゲン化酵素の精製

○秋田 明日香¹, 森田 悠揮¹, 鈴木 智美¹, 吉田 奈央子¹, 押木 守²¹名古屋工業大・社会学, ²長岡高専・環境都市

E-mail: akita.asuka@nitech.ac.jp

塩素化エチレンの脱塩素化呼吸細菌 (ORB) として各国で流通する *Dehalococcoides* 属細菌 (以下 Dhc) 製剤は、炭素数 3 以上の炭水化物をエネルギー源とした基質レベルでのリン酸化により増殖する、いわゆる発酵微生物、を含む複合微生物群集である。我々は、製品評価技術基盤機構が開発した「ビア樽などの耐圧力容器を用いた大量培養方法」に基づき、Dhc 単独でも安定して大量培養することができるか試みるとともに、菌体からの還元的脱ハロゲン化酵素 (Rdh) の精製を試みた。ORB として、最大で 4 mM のトリクロロエチレン (TCE) をエチレンまで脱塩素化し増殖する *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株および最大で 10 mM の 1,2-ジクロロエタン (1,2-DCA) をエチレンに脱塩素化し増殖する *Geobacter lovleyi* AY 株を用いた。ORB は、ミネラル塩、5 mM 酢酸ナトリウム、および 1 mM TCE を含む液体培地に、80% H₂ および 20% CO₂ の混合ガスを含むガラス製密閉瓶で維持し、必要に応じてビア樽にスケールアップした。脱塩素化酵素の精製は、菌体の超音波破碎液を超遠心して得た膜画分について界面活性剤抽出し、脱塩・濃縮の後、HiTrap Q XL および Superose 6 Increase カラムを用いたクロマトグラフィーにより精製した。NIT01 株の前培養物を容量比 18% (最終細胞密度: 1.2 × 10⁷ cells/mL 程度) で接種した結果、8 日間で添加した TCE が cisDCE および VC を介してエチレンまで脱塩素化し、最終的に 1.2 × 10⁸ cells/mL 程度の菌体密度を得た。本培養物を遠心分離することで得た菌体ペレットの湿重量で 0.77g 程度であり、小スケール培養物と同様に培養可能であることが示された。Rdh の抽出精製について検討した結果、界面活性剤として DDM を用いた場合で最も脱ハロゲン化活性の収率がよく 2 種のクロマトグラフィーでおおよそ 1 本の SDS-PAGE バンドが観察される状態まで精製可能であった。

P2-38

新規海洋性 DMSO 分解細菌

○石丸 悟¹, 木村 一平², 賀川 一郎², 長谷川 尚哉², 布施 博之²

¹芝浦工大・院, ²芝浦工大

《背景・目的》海洋で生産される硫化メチル (DMS) が地球規模での硫黄循環において重要な役割を果たしている。海水中で生産した DMS の多くが微生物によって分解されていると考えられているが、その分解材料は未解明の点が多い。海水中で DMS は DMSO と相互に変換しており、一般に DMSO の濃度の方が高い。そこで当研究室では DMS 及び DMSO を資化する微生物を海水から単離し、それらの菌について研究を行ってきており、Methylophaga 属に近縁な 3 株についてその性状の報告を行ってきた。(第 31 回本学会大会、環境微生物系学会合同大会 2017) 今回与那国島近海の高泥試料から DMSO を資化する yona 株を単離できたことから、これについて報告する。

《方法》DMS、DMDS をガスクロマトグラフィーにて、硫酸イオン、チオ硫酸、テトラチオネートを吸光光度法にて測定した。

《結果・考察》16S rRNA 遺伝子解析の結果から標準株の *Thiohalobacter thiocyanaticus* と 93 % の相同性を示した。新属新種の菌の可能性が高い。pH6-8 の範囲で生育を確認し、pH7.5 の条件下で最も早く生育が見られた。15-37℃ の範囲で生育が確認され、25℃ の条件下で最も早く生育した。NaCl 濃度 0.045-0.45 M (天然海水比 0.1 倍、0.5 倍、等倍) の範囲で生育が確認できたが、生育速度に差は見られなかった。NaCl 無添加では生育は見られなかった。生育基質としては DMS、DMSO、ピルビン酸、DMSP、酢酸で生育が可能であったが、メタノール、アミン類 (MMA、DMA、TMA) では生育が確認できなかった。DMSO の代謝産物として DMS と硫酸イオンが確認できたが DMDS、チオ硫酸、テトラチオネートは検出されなかった。このことから、この菌は DMSO をはじめに DMS に還元した後に硫酸イオンにまで変換すると推定された。今後はドラフトゲノムの解析を行い、DMSO の代謝関連遺伝子の解析を行っていききたい。

P2-39

新規海洋性プロピレン資化性菌

○山崎 一輝¹, 滝田 園子², 立林 日向子², 布施 博之²

¹芝浦工業大・院, ²芝浦工大

非メタン炭化水素 (NMHC) は、植生や燃料の燃焼などを発生源とし環境中に存在し、化学物質の生産や大気中の炭素循環に重要な役割を果たしています。NMHC は反応性が高いため、ヒドロキシルラジカルを吸収し、対流圏でのオゾンの生成と破壊に重要な役割を果たし、大気中で起こる光化学反応に影響を与える。NMHC の中でも特にエチレンやプロピレンなどの短鎖アルケン、重要な化学原料であり、植物や微生物だけでなく、他の天然および人工の発生源によっても環境に放出される。したがって、短鎖 NMHC の微生物分解は、地球規模の炭素循環にとってきわめて重要であるとされ、バイオオレメディエーションへの応用へ期待される。当研究では短鎖炭化水素資化性菌に関して研究を行っており、プロピレン資化性菌である *Halliea* 属近縁の PE-TB08W 株について報告されている。今回当研究室では、新規プロピレン資化性菌を取得することができたことから、その性状に関して報告を行う。日本沿岸の海水より、プロピレンを基質として単離を行った結果、yui 株、bigsight 株を取得した。これらをダイレクトシーケンス法を用いた結果、yui 株が *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* MCTG13d と 99.8% の相同性を示した。bigsight 株は *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* MCTG13d と 95% の相同性を示した。また、初発酸化酵素遺伝子に関しては、全ゲノム解析の結果、可溶性のモノオキシゲナーゼ (SDIMO) のみ所持していることが分かった。yui 株及び bigsight 株の VOC 分解能試験結果、1,1-ジクロロエチレン、ジクロロメタン、cis-1,3-ジクロロプロペン、trans-1,3-ジクロロプロペンの 4 種類の VOC に対する分解能を有することが分かった。生育としては、bigsight 株は pH7.0~7.5 で生育、生育基質としては、アセトンを用いることができる。また、アセトン、ピルビン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、プロピレン、2-ブタノール、1-ブテン、エタノール、n-ブタン、1-プロパノールを用いることができる。

P2-40

鉄に富む淡水堆積物中での嫌氣的メタン酸化

○柳川 勝紀¹, 菊池 早希子², 白石 史人³, 狩野 彰宏⁴

¹北九州市立大学, ²JAMSTEC, ³広島大学, ⁴東京大学

E-mail: kyanagawa@kitakyu-u.ac.jp

嫌氣的メタン酸化 (AOM) は、海水環境のみならず淡水環境でも重要なメタンシンクとして考えられている。海水環境では AOM を担う嫌氣的メタン酸化アーキアとして、ANME-1 から -3 のサブグループが、淡水環境では主に AAA (AOM-associated archaea) が関与する。淡水環境での AOM では、硝酸塩、硫酸塩、鉄 (III)、マンガン (IV) といった電子受容体が利用されるという報告があるが、多くが集積培養系からの考察に基づくものであり、自然環境中で実際に働く電子受容体の寄与や AOM を担う系統群に関する知見は少ない。本研究では、溶存鉄に富む湧水域近傍の堆積物中で期待される AOM に焦点を置き、生物地球化学的研究を実施した。堆積環境ではメタンと溶存鉄が高濃度で含まれており、硝酸塩や硫酸塩はほとんど検出されなかった。鉄 (III) に依存的な代謝を想定し、¹⁴C トレーサーを用いて、嫌気条件下でのメタン分解活性を測定したところ、0.9 pmol/cm³/day の反応速度が示された。AAA に属する系統は微生物群集の 5% ほど存在しており、対応する *mcrA* も検出された。さらに、定量 PCR で *mcrA* の分布を調べたところ、堆積物表層で最大値が示された。以上の結果より、水酸化鉄の供給が顕著な表層堆積物では、AAA による鉄依存的なメタンサイクルが活発であることが示唆された。

P2-41

メタン排出量の異なる 2 種類の水田土壌のメタン生成活性とメタン酸化活性の比較

○酒井 順子¹, 常田 岳志¹, 上蘭 一郎², 酒井 英光¹

¹農研機構・農環研, ²鹿児島農総セ

E-mail: kyoriko@affrc.go.jp

[背景と目的] 水田は農業分野における主要なメタン排出源の一つであり、メタン排出量の低減が求められている。新たなメタン排出低減法の作出を目的として、メタン排出量の大きく異なる 2 種類の水田土壌のメタン発生・抑制メカニズムの解明を行う。本研究ではその第一段階として、ガスフラックスと微生物活性の両面からメタン生成活性とメタン酸化活性を比較した。

[方法] 鹿児島県農業開発総合センターのメタン多量排出水田と国内平均量排出水田の作土層土壌を採取し、農研機構農業環境変動研究センターにおいて水稻 (ヒノヒカリ) をワグネルポット (1/2000a) で 5 週間栽培した。対照として水稻無栽培区を設けた。土壌二価鉄量 (酢酸緩衝液抽出) とポーラスカップで採取した土壌水の溶存メタンおよび二酸化炭素の量を 1 週間ごとに調査した。また移植後 3 週目と 5 週目にチャンバー法でメタンフラックスを測定した。メタンフラックス測定時には、水稻栽培ポットにメタン酸化阻害剤 (ジフルオロメタン) を処理し、無処理との差からメタン酸化能と生成能を算出した。たん水前、移植後 3 週目および 5 週目の土壌、試験終了時の水稻根から DNA と RNA を抽出し、定量 PCR 法で細菌と古細菌の rDNA、およびメタン生成遺伝子 *mcrA* とメタン酸化遺伝子 *pmoA* の存在数と発現量を計測した。

[結果と考察] 作土層土壌を用いたポット試験において、メタン多量排出水田土 (多量土) と平均量排出水田土 (平均土) でメタン排出量とメタン生成遺伝子発現量に大きな差が検出され、メタン多量排出の要因の少なくとも一部は作土層土壌にあることが示された。メタン酸化活性は、メタンフラックス解析およびメタン酸化遺伝子解析の双方において多量土で高く、メタン酸化活性の低いことがメタン多量排出の要因ではないと判断された。水稻を栽培しない場合でも、土壌水溶存メタン濃度とメタン生成遺伝子発現量は多量土が平均土を上回り、植物との相互作用の違いが多量排出の主因ではないことが示唆された。多量土では平均土に比べて細菌と古細菌の rDNA 発現量及び CO₂ 排出量の多いことに加えて、二価鉄の生成が速やかに進み還元状態に至るまでの期間が短かった。すなわち多量土では平均土に比べて微生物全体の活性が高いために、有機物の低分子化と土壌の還元化が急速に進み、その結果として多量のメタンが排出されると考えられた。

P2-42

手のひらとスマートフォン表面の菌叢比較解析

○吉原 静恵¹, 中上 奈都美², 木村 恒介³, 幡鈴 威吹³, 倉橋 健介³, 徳本 勇人¹

¹阪府大・院理, ²阪府大・生命環境, ³阪府大高専・環境物質科学

E-mail: yoshihara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【目的】人間の体には様々な細菌が存在しており、部位特異的な菌叢が盛んに解析されている。先行研究によって、手のひらに定着している常在菌叢に手洗い方法や洗浄剤が与える影響を解析した結果、健康な手のひらに存在する常在菌叢は、水による手洗い、洗剤による手洗いの影響を受けないことを明らかにしている。しかし、手のひらと、手で触れる接触物表面の菌叢に関する知見は少ない。本研究では、手のひらと頻繁に触れるスマートフォン表面に存在する菌叢を解析することにより、手のひら常在菌叢と接触物の菌叢との相関性を解析した。【方法】手荒れや傷のない健康な手のひらと、被験者が保有するスマートフォンの表面に存在する常在菌叢をスワブ法により回収した。菌叢のDNAをMORA-EXTRACTを用いて抽出した後、16S rRNA 遺伝子のV1-V2領域を標的としてPCRにより増幅し、次世代シーケンサーを用いた菌叢のメタゲノム解析を行った。得られた配列情報の解析には、16S rRNA 解析のアプリケーションのひとつであるQIIMEを用いた。さらに、Operational Taxonomic Unit (OTU) 配列を用いて16S rRNA 配列データベースに対してBLAST検索を行い、最も高い相同性を示す全長16S rRNA 配列を抽出して系統解析を行った。【結果および考察】手のひらとスマートフォン表面から、それぞれ約10万リードの配列情報が得られた。QIIMEを用いてV1-V2領域のOTU配列をもとに系統解析を行い、菌叢を属レベルまで分類した。その結果、スマートフォン表面には、健康な手のひらの常在菌として検出されるStaphylococcus, Clostridiales, Bacillaceae, Veillonellaceaeなどの菌叢が検出された。これらの結果から、皮膚の常在菌叢が接触物に伝播すること、さらに無機質な物質の上でも常在菌は維持されることが明らかになった。今後、抗菌性材料の開発において、皮膚の常在菌として単離されている菌の付着性、定着性などを調べることで、抗菌性の評価につなげることができると期待される。

P2-43

手のひら常在菌叢の構造解析とその評価

木村 恒介¹, 中上 奈都美², 幡鈴 威吹¹, 吉原 静恵³, 倉橋 健介¹, ○徳本 勇人³

¹阪府大高専・環境物質科学, ²阪府大・生命環境, ³阪府大・院理

E-mail: k-kurahashi@osaka-pct.ac.jp

【目的】一般に、皮膚に存在する菌は常在菌と通過菌に大別でき、通過菌は伝染性膿痂疹（とびひ）や食中毒などを引き起こすものが多く含まれるのに対して、常在菌が存在すると通過菌の増殖が抑制され、身体が保護されることが知られている。本研究では、手のひらの常在菌叢をメタゲノム解析し、健康な手のひらに定着する菌叢を同定した。また、比較として、手洗いの後の手のひらに定着する菌叢を解析し、手のひらの常在菌叢としての評価方法の検討を加えた。そこで、次世代シーケンサー解析で得られる16S rRNAの部分配列をもとに全長16S rRNA配列を予想することによって、菌叢の種レベルでの分類を実施した。【方法】洗浄剤を用いて、手のひらの洗浄を行い、風乾して1時間30分放置したものを定常状態とした。定常状態の手のひらを、流水で30秒洗浄したものを条件1、洗浄剤で15秒、流水で15秒洗浄したものを条件2として洗浄した。被験者3人に対し、手荒れや傷のない健康な手のひらからスワブを用いて菌叢を採取した。菌叢のDNAをMORA-EXTRACTを用いて抽出した後、16S rRNA 遺伝子のV1-V2領域を標的としてPCRにより増幅し、次世代シーケンサーを用いた菌叢のメタゲノム解析を行った。得られた配列情報の解析には、16S rRNA 解析のアプリケーションのひとつであるQIIMEを用いた。Operational Taxonomic Unit (OTU) 配列を用いて16S rRNA 配列データベースに対してBLAST検索を行い、最も高い相同性を示す全長16S rRNA 配列を抽出して系統解析を行った。【結果および考察】各サンプルから、それぞれ10万リードの配列情報が得られた。V1-V2領域のOTU配列をもとに系統解析を行い、菌叢を属レベルまで分類した結果、手のひらの菌叢は被験者にかかわらずほとんど同じ菌叢構造を示し、個人差は非常に小さいことがわかった。また、手洗い前後についても、洗浄剤使用の有無にかかわらずほとんど変化がなかったことから、本解析条件では手のひら常在菌叢は安定的に存在することがわかった。一方、OTU配列をもとに抽出した全長16S rRNAを再解析した結果、皮膚常在菌として知られているStaphylococcus属を12の種に分類することができ、1種は洗浄剤使用によって有意に減少することを見出した。

P2-44

麴甘酒および乳酸発酵甘酒がデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎モデルラットの腸内細菌叢に及ぼす影響

○井口 晃徳¹, 櫻井 美仁¹, 堀 沙織里¹, 山口 利男², 重松 亨¹, 久保田 真敏¹, 倉橋 敦³, 小黒 芳史³, 西脇 俊和⁴, 相原 浩太郎⁴, 佐藤 眞治¹

¹新潟薬大・応生科, ²新潟薬大・薬学部, ³八海醸造(株), ⁴新潟農総研食研セ

E-mail: a_iguchi@nupals.ac.jp

【目的】麴甘酒はその栄養価から滋養剤として古くから親しまれており、整腸効果や美肌効果、抗酸化活性を有するという報告がなされている。最近では麴甘酒の機能性向上、風味改善の目的で乳酸発酵を行った『乳酸発酵甘酒』も市販されている。本研究では麴甘酒と乳酸菌による整腸効果に着目し、麴甘酒と乳酸発酵甘酒がデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎モデルラットの腸内細菌叢に及ぼす影響を調査した。

【方法】試験試料として、米麴甘酒(八海醸造製)、*Lactobacillus sakei* strain Uonuma (ウオノマ株) で乳酸発酵を行った乳酸発酵甘酒、およびウオノマ株(殺菌)を用意し、それぞれ凍結乾燥を行ったものをAIN-93M飼料に混餌した。供試動物としてWistar系雄性ラット(8週齢)を用い、1週間の馴化後、試験飼料を4週間摂餌した後、飲水を2.0% DSS含有蒸留水に切り替え2週間飼養した。馴化後、摂餌後、飼養後の各群の糞便試料を回収し、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析に供した。

【結果・考察】摂餌量および飲水量については、全期間において各群有意差が認められなかった。しかしDisease Activity IndexスコアはDSS群で非DSS投与(Normal)群と比較して有意に高い値を示した一方、麴甘酒(A)群、乳酸発酵甘酒(LA)群およびウオノマ株(L)群ではDSS群よりも低い値を示し、大腸炎に対する抑制傾向が認められた。腸内細菌叢解析の結果、馴化後および摂餌後の細菌叢は試験群によらずS24-7科細菌が最も優占しており、次いでErysipelotrichaceae綱、*Phascolarctobacterium*属、*Lactococcus*属等に属する細菌が高頻度に検出された。飼養後ではNormal群を除くほとんどの試験群においてAllobaculum属細菌が高頻度に検出され、S24-7科細菌の検出頻度が低下した。飼養後のDSS群およびL群においてはS24-7科細菌がほぼ検出されなかったが、A群およびLA群では比較的検出される傾向が見られた。各試験群の腸内細菌叢を主座標分析に供したところ、飼養後のNormal群とDSS群のプロットが異なる位置にクラスターを形成していたが、A群およびLA群のプロットはいずれもNormal群のクラスターと近い距離に位置する傾向が見られた。このことから麴甘酒ならびに乳酸発酵甘酒の摂取は大腸炎モデルラットの腸内細菌叢を発症以前の状態に維持できる可能性が示された。

P2-45

Distribution and phylogenetic diversity of *Campylobacter jejuni* HS:19 in Japan

○Hiroshi Asakura¹, Junko Sakata², Satoru Akase³, Shiori Yamamoto¹, Jun Kawase⁴

¹Nat. Inst. Health Sci., ²Osaka Inst. Public Health, ³Tokyo Metropolitan Inst. Public Health, ⁴Shimane Pref. Inst. Public Health

Campylobacter jejuni is one of the leading foodborne pathogen that causes gastroenteritis in humans in the developed countries worldwide. Epidemiological data have mounted evidence that *C. jejuni* expressing certain classes of lipooligosaccharides (LOS) have potential to develop Guillain Barre Syndrome (GBS). *C. jejuni* categorized to HS:41, HS:19, HS:23 are mainly considered to associate the development of GBS in western countries, while little is known about the distribution of such *C. jejuni* subpopulation in foodborne infection cases in Japan. As was considered the much numbers of incidences of foodborne campylobacteriosis, this study thus aimed at investigating the distribution of representative HS types of *C. jejuni* based on the foodborne statistic records including pathogen typing. The result showed the relative greater proportion of *C. jejuni* HS:19 than other GBS-associated HS types such as HS:41, which were one of the main types in US and EU. A total of 15 *C. jejuni* HS:19 strains were then genome-sequenced, revealing high genomic similarity of the HS:19 strains regardless of their source and geographical differences, compared with the other HS types. In this support, sequence type of the former was identical. We are currently exploring the phenotype characterized by the HS:19 strains.

P2-46

国内水冷却塔のバイオフィームおよび循環水における細菌叢のメタ 16S rRNA 解析

○重松 奈公子¹, 齊藤 啓太², 山本 哲司³, 菅井 由也², 西尾 正也³, 矢野 剛久¹, 森本 拓也¹, 永井 智¹¹花王(株)安全性科学研究所, ²花王(株)生物科学研究所, ³花王(株)ハウスホールド研究所

E-mail: arima.naoko@kao.com

【背景と目的】水冷却塔は機能的・物理的観点から微生物が混入しやすく、その熱交換器内部にバイオフィーム (BF) を形成しやすい。BF が形成されると、レジオネラを始めとする危害菌の増殖や電気使用量の増加によるコストの増大を引き起こすため、その制御が求められている。BF 制御を考える上では、BF を形成する微生物叢を理解することが重要であると考えられるが、水冷却塔における BF 形成量と BF を形成する微生物叢との関連を検討した報告はない。そこで、水冷却塔 BF 制御法を探索するため国内水冷却塔における BF 形成およびその菌叢の実態を初めて網羅的に調査し、BF 形成量に寄与する因子およびその菌叢の特徴を検討した。【方法】花王工場にて稼働している水冷却塔のうち冬期 27 機、夏期 36 機を用いて検討した。同水冷却塔内に SUS 板を沈め、SUS 板上に付着した BF 量を測定した。また、水冷却塔循環水および BF を採取し、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA V3V4 領域情報に基づく菌叢解析を行った。水温、pH、塩素濃度および各種無機イオン濃度等の水質については、水冷却塔循環水を用いて測定した。【結果】水冷却塔における BF 形成量は時期によらず一定であるが、BF が形成されやすい水冷却塔は冬期と夏期で必ずしも同一ではなかった。また、BF 形成量に寄与する因子を検討したところ、水冷却塔における BF 制御には、塩素濃度を適正に保つことと有機物のコントロールが重要であることが示唆された。一方、水冷却塔循環水および BF における菌叢を解析した結果、水冷却塔循環水および BF の菌叢類似性は高かった。さらに、それらは Commamonadaceae, Bacillaceae, Flavobacteriaceae の構成比により 4 つにクラスタリングされ、それらは水質によらないことが明らかとなった。

P2-47

嫌気性繊毛虫 GW7 株におけるメタン生成アーキア、バクテリアとの共生関係

竹下 和貴^{1,4}, 山田 尊貴¹, 川原 邑斗¹, 成廣 隆², 伊藤 通浩¹, 鎌形 洋一², 山崎 玲^{1,3}, ○新里 尚也^{1,3}¹琉球大・熱生研, ²産総研・生物プロセス, ³琉球大・理, ⁴秋田県立大・生物資源

嫌気性繊毛虫の一部の系統では、しばしばメタン生成アーキアとバクテリアが細胞内に共生していることが報告されている。このような 3 者間共生系は、宿主と共生者がそれぞれ異なるドメインに属している点においてユニークであり興味深い研究対象となっている。その一方で、嫌気性繊毛虫の培養株は極めて少なく、宿主繊毛虫と共生体との生理学的な関係性については多くが明らかとなっていない。当研究室では、2016年に沖縄県内の排水処理場より、Scuticociliatia 亜綱に属する新規な嫌気性繊毛虫として GW7 株の培養に成功した。また、GW7 株は 2 種の原核共生体を保持しており、その一つは *Methanoregula* 属の未同定メタン生成アーキアであり、もう一つは Alphaproteobacteria に属する未報告種であった。現在、この未報告種に関して、“*Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus*” という種名を提案している (Takeshita et al., in revision)。これらの共生体はいずれも繊毛虫内においてプロトン還元により余剰還元力を処理する細胞内小器官であるヒドロゲノソームに密着して存在しており、水素等の共通の代謝産物に依存している可能性がある。そこで本研究では、両共生体の宿主繊毛虫への寄与を明らかにすることを目的に、メタン生成の特異的阻害剤であるプロモエタンスルホン酸 (BES) とバクテリアの生育を広く阻害するテトラサイクリンを添加して両共生体を選択的に欠失させ、宿主繊毛虫への影響を代謝産物分析により評価した。その結果、いずれの場合も GW7 株の生育が著しく阻害され、宿主繊毛虫の生育に両方の共生体の存在が不可欠である可能性が示唆された。一方の代謝産物分析では、無処理では同定可能な有機酸は検出されず、テトラサイクリンを投与した系では、プロピオン酸が、BES を投与した系ではさらに酢酸が検出された。抗生物質を投与したことによる有機酸の蓄積は、共生体の欠失によって繊毛虫内の水素消費 (余剰還元力処理) が滞ったことで基質酸化が十分に行えなくなり、中間代謝産物である有機酸が生成した可能性が考えられた。しかしながら、これらの共生体がいずれも水素消費に寄与しているかについては、今後詳細に検討していく予定である。

P2-48

活性汚泥から単離された*N*-アシルホモセリンラクトン分解細菌*Roseomonas* sp. TAS13のLuxR solo機能解析

○奈須野 恵理¹, 遠藤 瑞歩², 加藤 紀弘¹

¹宇大・院地域創生, ²宇大・工

E-mail: e-nasuno@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】当研究室で活性汚泥から単離された*Roseomonas* sp. TAS13は、グラム陰性細菌のQuorum Sensing (QS) 機構で主要なシグナル物質として利用されている*N*-acylhomoserine lactone (AHL) の加水分解活性を有する。TAS13株のドラフトゲノムからは、既知のAHL加水分解酵素とアミノ酸配列相同性が高い複数のタンパク質だけでなく、LuxR型のAHLレセプターが同定された。しかし、対になるAHL合成酵素の遺伝子は存在しないことから、LuxR soloであることが示唆された。これまでに、NCBIデータベースに登録されている細菌ゲノムから同定されたLuxR遺伝子のうち約80%はLuxR soloであることが明らかとなっているが、LuxR soloとAHLの相互作用解析はわずか数例しか報告されていない。そこで、本研究ではTAS13株のLuxR soloをRotRと命名し遺伝子をクローニングしてアシル鎖長の異なるAHLに対する相互作用を解析することを目的とした。

【方法】TAS13株ゲノム配列からRotR増幅用プライマーを設計し、PCR産物をMBP融合タンパク質発現用ベクターに挿入して*Escherichia coli* DH5 α へ形質転換した。アシル鎖長がC6～C12のAHLを終濃度が20 μ Mとなるよう添加した300 mLのLB培地中でMBP-RotRを発現する遺伝子組換え大腸菌を振とう培養した(37°C, 24 h)。遠心分離した培養液から回収した菌体ペレットをPBS bufferで4回洗浄し、RotRと相互作用していないAHLを除去した。洗浄後のペレットから酢酸エチルを用いてRotR-AHL複合体を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)法及びAHLレポーター株*Chromobacterium violaceum* CV026, VIRO7を用いたバイオアッセイによりAHLを検出した。

【結果】アシル鎖長がC6のAHLではRotRとの親和性が確認できなかったのに対して、疎水性の強いC8～C12のAHLではピオラセインの生産が誘導されたことからRotR-AHLの相互作用が示唆された。さらに、C10のAHLと比較して疎水性の強いC12のAHLに対するRotRの親和性がより高いことが示唆された。RotRがAHL以外のシグナル分子に応答する可能性も残されているが、今後さらにLuxR soloの知見が増えることでRotRと親和性のあるAHL以外のシグナル分子の情報が得られると期待される。

P2-49

種間相互作用が駆動する病原性細菌の適応進化動態： 進化実験アプローチによる解析

○山本 京祐^{1,2}, 草田 裕之¹, 田村 具博^{1,3}, 鎌形 洋一¹, 玉木 秀幸^{1,2,4}

¹産総研・生物プロセス, ²筑波大・生命環境, ³CBB-D-OIL, ⁴東大・生セ

E-mail: k.yamamoto@aist.go.jp

【背景・目的】緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa* (PA)と黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus* (SA)は共に環境常在菌かつ重要な病原菌であり、自然突然変異や外来遺伝子獲得、バイオフィーム形成等によって薬剤耐性が容易に生じることから、院内感染等の原因菌として特に注意を要する菌である。両種はヒト慢性感染創においてしばしば共存し相互に排除し合う競合関係にあることから(例: PAによるSA生育阻害、SAによるPAバイオフィーム形成阻害等)、両種間の相互作用が選択圧となりそれぞれの進化動態に影響を与えることで薬剤耐性等に繋がる様々な表現型の進化をもたらしている可能性がある。そこで本研究では、モデル共培養進化実験系を用いてPAとSAの進化動態を解析することで、病原菌間の相互作用が進化の方向や速度に及ぼす影響を評価することを目的とした。

【方法・結果】緑膿菌PAO1株と黄色ブドウ球菌Newman株およびMu50株を用いてそれぞれの純粋培養系およびPA-SA共培養系を構築し、静置条件下で約3週間継代培養(24h毎に継代)を実施した。両種の生育と進化をそれぞれ生菌数とコロニー形態変化を指標にモニタリングしたところ、PAは純粋培養系、共培養系どちらにおいても培養期間を通じて一貫して高い生菌数を維持し(10⁹ cell/mL程度)、培養開始3~5日程度でコロニー形態の変化した様々な進化株が現れ始め、それら進化株はその後集団内で優占化していった。一方SAのコロニー形態変化はほとんどみられず、また、PAとの共培養系では比較的小さな個体群サイズのまま推移した(10⁶~10⁷ cell/mL程度)。培養終了時の細胞集団から全ゲノムを抽出し、集団ゲノムリシーケンシング解析によって各菌株の変異箇所を解析した。PA集団ゲノムにおける変異箇所はc-di-GMPシグナリングや線毛合成系関連遺伝子を中心に見出され、純粋培養系と共培養系とで大きな差はみられなかったが、SA集団ゲノムではPAとの共培養系で病原性や薬剤耐性に関与することが知られる複数の遺伝子上に高頻度で変異がみられた。このように、病原菌の医学上重要な表現型の進化に種間相互作用が寄与することが示唆された。発表では、単離した進化株の表現型試験の結果も合わせて議論する。

P2-50

カブトムシ幼虫の腸内環境と微生物群集構造について

○和田 典子¹, 岩淵 範之¹, 瀧原 速仁², 奥田 修二郎², 砂入 道夫¹, 岩田 隆太郎¹, 安齋 寛¹

¹日大・生資科, ²新潟大院・医歯学

E-mail: wada.noriko@nihon-u.ac.jp

【目的】一般に森林において、落葉落枝として林床に供給される有機物は、土壤中の微生物や土壌動物などにより分解され循環利用されている。この物質循環への土壌動物の役割を明らかにするには、その腸内環境の物理化学的、生化学的な側面と共生微生物叢とを調査し、総合的に理解する必要がある。森林性昆虫であるカブトムシ (*Trypoxylus dichotomus*) 幼虫は、森林土壌を摂食・分解することで生育している。また、他の森林性昆虫の幼虫よりもサイズが大きいため、森林生態系中の物質循環に与える影響が大きいと考えられる。そのため、森林生態系の中での物質循環に対する土壌動物の影響を調査するための格好のモデル動物である。我々はこれまでに、カブトムシ幼虫の消化管を10分割し、それぞれの画分についての腸内環境の物理化学的、生化学的条件を検討してきた。その結果、中腸に pH、カリウムイオンと酢酸の濃度に部位特異的な勾配があることを見出した。カブトムシ幼虫の消化管は基本的に高アルカリ性であるが、この中でも特に、中腸の部位、pH、カリウムイオン濃度に高い相関があることを見出した。本研究では、これら特徴的な腸内環境中にどのような微生物が存在するのかを明らかにするために各種解析を行った。【結果と考察】カブトムシ幼虫の消化管を10分割し、それぞれの画分から Total DNA を取得し、PCR-DGGE、Miseq 解析を行った。PCR-DGGE の結果、中腸と後腸ではその微生物叢が大きく異なることが示された。特に中腸では、中央部から終わりにかけて部位特異的に優占化している配列を見出した。本配列は、既知の配列とは高い相同性を示さない特徴的なものであり、この配列を GTD (*Gut T. dichotomus*) と名付け、その全長をクローニングした。続いて Miseq によるシーケンス解析を行い、消化管の各画分での GTD 配列の存在比を検討したところ、多くの画分で高い存在比を示し、GTD 配列を有する細菌が中腸で部位特異的に優占化していることが示された。また、GTD の次に存在比の高かった配列群にも、既知の配列と高い相同性を示すものは含まれなかった。以上の結果は、カブトムシ幼虫の中腸には多くの未知微生物が存在していることを意味しており、現在、当該細菌の単離や局所的な環境との関連性を検討している。

P2-51

カメムシが環境中から獲得する細胞内共生細菌のゲノム特性

○竹下 和貴¹, 菊池 義智²

¹秋田県大・生物資源, ²産総研・生物プロセス

E-mail: kazu-t@akita-pu.ac.jp

多くの昆虫が体内に共生細菌を保持し緊密な相互作用を行っているが、共生の分子基盤や進化プロセスに関してはいまだ不明な点が多い。特に昆虫に広く見られる細胞内共生では、母から子へと共生細菌が受け継がれることから、極端に遺伝子流入機会が低くボトルネック効果が高い。このため、共生細菌は独自の進化を遂げ、ゲノムが大幅に縮退してしまっている。次世代シーケンス技術の発展とともに昆虫細胞内共生細菌の解読ゲノム数は増加しているものの、近縁といわれる自由生活性細菌のゲノムとは10倍程度もサイズ差があり、ゲノム比較から共生細菌へと至る進化プロセスに迫ることは困難である。植食性カメムシ (カメムシ目) の中でもホシカメムシ上科、ヘリカメムシ上科、ナガカメムシ上科に属する多くのカメムシ類は、毎世代環境中から *Burkholderia* 属の細菌を獲得し、消化管後端部に発達させた袋状組織 (盲囊) の内腔に保持する「環境獲得型の腸内共生」を築いている。我々は最近、コバネヒョウタンナガカメムシ (ナガカメムシ上科・ヒョウタンナガカメムシ科) やオオホシカメムシ (ホシカメムシ上科・オオホシカメムシ科) において、環境中から獲得された共生細菌が盲囊内腔だけでなくその上皮細胞内にも侵入し細胞内共生していることを発見した。他の昆虫では例を見ないこの「環境獲得型の細胞内共生」は、細胞内共生関係が成立してからまだ日が浅いためか、共生細菌の単離培養が容易であり、昆虫における細胞内共生の分子基盤や進化プロセスを理解する上で最適な研究対象であるといえる。本発表では、コバネヒョウタンナガカメムシとオオホシカメムシそれぞれの細胞内共生細菌について完全ゲノムを決定したので報告する。予想通り、これら細胞内共生細菌ゲノムは他の昆虫細胞内共生細菌と比べてサイズがはるかに大きく、近縁の自由生活性細菌と比べてもゲノムの縮退は起きていなかった。これら細胞内共生細菌ゲノム間やホソヘリカメムシの腸内共生細菌ゲノム、近縁の自由生活性細菌ゲノムとの比較解析結果にも触れ、環境獲得型の細胞内共生細菌についてそのゲノム特性を炙り出す。

P2-52

トカラ列島におけるヤマトシロアリ属のシロアリと共生原生生物組成

○北出 理¹, 石神 広太², 嶋田 拓也², 野田 悟子³¹茨城大・理, ²茨城大・院理工, ³山梨大・生命環境

E-mail: osamu.kitade.sci@vc.ibaraki.ac.jp

シロアリ類はその後腸内に、副基体類・オキシモナス類に属する共生原生生物の群集を保有し、群集の種構成は基本的に宿主種に特異的である。これは宿主と嫌気性原生生物の緊密な共生関係と、コロニー・世代間での伝達様式を反映するものと考えられる。ヤマトシロアリ属 *Reticulitermes* のシロアリは、日本列島では北海道南部から八重山諸島にかけて7種が分布する。これらの種では、宿主種ごとに原生生物の基本的な種組成が一定であること、群集構成種の類似性が地理的分布と対応し、とくに屋久島と奄美大島の間に最大の組成の差があること、が示されている。この2島の間に存在するトカラ列島には7つの有人島が含まれる。トカラ列島域は、動物地理学上の旧北区と東洋区の境界（渡瀬線）がある場所に相当し、その南北ではシロアリに限らず、多くの動物分類群の組成に大きな差が見られる。トカラ列島にヤマトシロアリ属が分布することは報告されているが、詳しい種と共生原生生物の組成については不明確であった。本研究では、2018年12月と2019年5月にトカラ列島の口之島、中之島、諏訪之瀬島、悪石島、宝島の5島を調査し、本属のシロアリのコロニーを採集した。採集したコロニーはソルジャーの形態の観察、宿主の腸内容物の鍍銀染色標本を作成と観察を行った。さらに計26のコロニーについて、各5個体のシロアリの後腸内容物中の共生原生生物を生きた状態で検鏡し、種組成とその変異を調査した。調査を行った5島のうち、北部の口之島・中之島・諏訪之瀬島では北方系のヤマトシロアリ *R. speratus* と南方系のアマミシロアリ *R. amamianus* の2種が、南部の悪石島と宝島からは南方系のアマミシロアリのみが採集された。トカラ列島は両系統の分布の移行域になっていると考えられる。ヤマトシロアリの原生生物組成は基本的にトカラ列島外と共通する組成であったが、コロニーレベルでの特定の種の欠損が比較的多かった。またアマミシロアリでは、中之島を除く4島の個体群で、日本産宿主ではヤマトシロアリだけから見つかっている原生生物種 *Trichomonoides* sp. が確認された。これまでの知見を総合し、ヤマトシロアリ属の宿主系統と共生原生生物組成の対応、シロアリの交雑と原生生物の種間感染の可能性についても議論する。

P2-53

シロアリ腸内から分離された新規 *Paraburkholderia* 属細菌2種の比較解析

○雪 真弘, 高島 昌子, 清水 美智留, 加藤 真悟, 大熊 盛也

理研BRC・JCM

E-mail: masahiro.yuki@riken.jp

シロアリは木材を効率的に分解することで知られている。この高効率の分解を担っているのは、腸内に共生する微生物であることがメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析から推定されている。しかし、シロアリ腸内共生微生物の多くが難培養性であるため、実際の木材分解能に関する生化学的解析を行うことは非常に困難である。特に、木材の主成分であるリグニンの分解に関しては、これまでのメタゲノム、メタトランスクリプトーム解析からも詳細はわかっていないのが現状である。本研究では、リグニンの分解に関わるシロアリ腸内細菌の分離を目指し、芳香族化合物を含む培地を用いて分離培養を試みた。イエシロアリの腸管を前腸、中腸、後腸に分画し、各腸内内容物を芳香族化合物含有寒天培地に撒き、好気条件で培養した。その結果、前腸と後腸から2種の新規 *Paraburkholderia* 属細菌 Fg33 株、Hg4 株の分離に成功し、イルミナ MiSeq と ナノポアテクノロジー MinION を組み合わせたゲノム解析を行った。Fg33 株のゲノムは 3.8 Mb, 2.4 Mb, 0.9 Mb の3本の環状染色体から構成され、Hg4 株は 3.2 Mb, 1.7 Mb, 1.1 Mb, 1.1 Mb の4本の環状染色体から構成される。この配列から得られた Fg33 株、Hg4 株の 16S rRNA 遺伝子はともに、分離培養されている株では *Paraburkholderia phymatum* に相同性 96% で最も近縁であった。Average Amino acid Identity (AAI) を用いて Fg33 株、Hg4 株と *P. phymatum* の比較した結果、それぞれ 72.2%、72.5% であった。両菌株はリグニン由来の芳香族化合物分解に関連する遺伝子を有しており、低分子性リグニンを資化できることが確認された。今後は、高分子性リグニンの分解能力を明らかにし、シロアリ腸内の高効率のリグノセルロース分解への寄与を解明する。

P2-54

原生生物細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌の宿主環境への適応進化による基幹代謝系の改変

伊澤 和輝¹, 雪 真弘², 吉岡 拓哉¹, 桑原 宏和¹, 大熊 盛也², ○本郷 裕一^{1,2}

¹東工大・生命理工, ²理研BRC-JCM

E-mail: izawa@bi.c.titech.ac.jp

Endomicrobium 属細菌 (*Elusimicrobia* 門) は下等シロアリ腸内に優占種群として存在し、多くの種は特定の木質分解性原生生物種の細胞内に絶対共生している。ヤマトシロアリ腸内原生生物 *Trichonympha agilis* の細胞内共生体である "*Ca. Endomicrobium trichonymphae*" Rs-D17 系統のゲノム解析 (Hongoh et al 2008 PNAS; Izawa et al. 2016 GBE) によると、同細菌系統はグルコース 6リン酸とウロン酸を宿主細胞質から取り込み、水素、酢酸、エタノール、二酸化炭素へと嫌氣的に発酵すると予測され、共生体としての役割は木質に不足するアミノ酸と補酵素類の合成・供給であると考えられている。今回我々は、新たにシロアリ腸内原生生物細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌 5 種の完全長あるいはドラフト・ゲノム配列を取得し、上記の Rs-D17 系統とシロアリ腸内自由生活型細菌である *Endomicrobium proavitum* を含めた比較ゲノム解析を行った。その結果、いずれも多種のアミノ酸・補酵素合成経路を保持しており、共生体としての役割は同様であると予測されたが、解糖系及び発酵経路において大きな差異が見出された。特に、グルコース 6リン酸とウロン酸の利用比率、発酵産物の種類とその産物量の予想比率等が各種間で異なると推定しており、宿主原生生物細胞の環境の相違との関連を考察する。

P2-55

沖縄微生物ライブラリーを利用した植物病原糸状菌の抑制 (2)

○上野 誠^{1,3,4}, 田村 朋子², 権藤 由理³, Ganphung Rattrikorn⁴, 新里 尚也⁵, 伊藤 通浩⁵

¹島根大・生資, ²元島根大・生資, ³島根大・自然科学, ⁴鳥大院・連農, ⁵琉球大・熱生研

E-mail: makoto-u@life.shimane-u.ac.jp

沖縄微生物ライブラリーには、亜熱帯地域である沖縄県内の島々で分離された微生物が保存されており、植物病原菌の防除に利用可能な微生物が存在する可能性がある。実際に沖縄微生物ライブラリーからは、植物病原糸状菌 (イネいもち病菌、キュウリ褐斑病菌及びマンゴー炭疽病菌) に対して抑制効果を示す複数の微生物がスクリーニングされた。前回の大会 (第32回大会) では、沖縄微生物ライブラリーに保存されている *Streptomyces erythrochromogenes* と高い相同性を示す 3-45 菌株や *Streptomyces levis* と高い相同性を示す 4-27 菌株が、特殊な培養により、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制する物質を菌体内に生産し、イネ植物体上でもイネいもち病菌の発病を抑制することを報告した。また、菌体抽出液中に生産される付着器の異常な拡大の誘導及びメラニン化を抑制する物質は高分子で熱安定な糖や脂質を含む物質である可能性が示された。今回、イネいもち病菌のメラニン合成遺伝子の発現をリアルタイム PCR により調査した。その結果、3-45 菌株及び 4-27 菌株の菌体抽出液のイネいもち病菌への処理は、メラニン合成遺伝子の発現を抑制した。一方、*S. levis* である NBRC15423 は、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大とメラニン化の抑制を誘導したが、*S. erythrochromogenes* である NBRC3304 菌株の菌体抽出液では、それらは誘導されなかった。さらに、3-45 菌株及び 4-27 菌株の菌体抽出液の他の植物病原糸状菌に対する影響を調査した。その結果、3-45 菌株及び 4-27 菌株の菌体抽出液は、イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*)、キュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) 及びキュウリ炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) の発芽管の先を球状に膨潤させ、イネ (品種: コシヒカリ) 及びキュウリ (品種: 北進) での植物体への感染を抑制した。これらの結果は、3-45 菌株及び 4-27 菌株の菌体抽出液中の物質が、イネいもち病菌だけでなく、複数の植物病原糸状菌の発芽先端部を球状に膨潤させ、植物体への感染を抑制できることを示した。現在、イネいもち病菌を用いて、付着器の異常な拡大やメラニン化の抑制に関わる菌体抽出液中の物質の同定とその作用機構について調査中である。

P2-56

トマトかいよう病菌を用いた乳酸菌のスクリーニング

○乙黒 美彩¹, 柴谷 浩平¹, 山村 英樹², 早川 正幸², 柳田 藤寿¹¹山梨大院・ワイン研, ²山梨大院・生命環境学域

E-mail: motoguro@yamanashi.ac.jp

【目的】 トマトかいよう病はグラム陽性菌の *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* を原因菌とした細菌性植物病害であり、種子伝染、接触伝染、土壌伝染をすることが知られている。本研究では、トマトかいよう病菌に対して抗菌活性を有する乳酸菌のスクリーニングを行い、土壌中での乳酸菌の施用効果を調査することを目的とした。【材料および方法】 試験乳酸菌株は当研究室で2009年に京漬物から分離・保存した乳酸菌と比較対象菌としてバクテリオシン生産菌の *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 の計180株を用いた。被試験菌株は *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 3株 (MAFF 301040, MAFF 301041, NBRC 13762) を供試した。アガーウェル拡散法を用いてスクリーニングを行った。抗菌性が認められた分離株については16S rDNA解析, recA遺伝子解析から同定を行った。一部の分離株については、殺菌土壌に乳酸菌分離株と *C. michiganensis* を接種し、各菌数を計測することで、土壌への施用効果および施用方法を検討した。【結果および考察】 *Lac. lactis* NBRC 12007 は *C. michiganensis* 3株に対して抗菌活性を有していた。一方、乳酸菌保存株23株は *C. michiganensis* MAFF 301041 または NBRC 13762 に対して *L. lactis* NBRC 12007 と同程度の活性が認められた。これら23株は16S rRNA 遺伝子配列解析の結果 *Lactobacillus plantarum* グループと同定した。さらに recA 遺伝子解析から20株が *Lactobacillus plantarum* に、2株が *L. paraplantarum*, 1株が *L. pentosus* と同定した。 *C. michiganensis* に汚染された土壌に乳酸菌分離株068-3株を添加すると12日後の土壌中の *C. michiganensis* は有意に減少しており、068-3株の効果が認められた。

P2-57

Pseudomonas 属植物保護細菌における二次代謝物産生能間調節機構○染谷 信孝¹, 竹内 香純², 諸星 知広³¹農研機構・野花研, ²農研機構・生物研, ³宇都宮大・院工

E-mail: someyan@affrc.go.jp

Pseudomonas 属は様々な環境に生息するグラム陰性細菌である。本属は約190種で構成され、多くの種は土壌、水圏および動植物周辺などで腐生的生活環を送るが、一部の種は動植物病原体として知られる。土壌または植物周辺で生息する非病原性種中には、植物近傍に定着すると結果的に植物病害を抑えるものが存在し、このような能力を有する細菌を近年では植物保護細菌と呼ぶ。*Pseudomonas* 属では、*Pseudomonas protegens* および *Pseudomonas chlororaphis* 種に属する多くの菌株が植物保護細菌として認められている。これらの植物保護細菌は抗菌性二次代謝産物を産生して植物病原体の生育を阻害する。*P. protegens* および *P. chlororaphis* 両種が共通して産生する抗菌物質として、Hydrogen cyanide (HCN) および Pyrrolnitrin (PRN) がある。一方で *P. protegens* のみが産生する抗菌物質として、2,4-diacetylphloroglucinol (PHL) および pyoluteorin (PLT)、*P. chlororaphis* のみが産生する抗菌物質として phenazines (PHZ) がある。両種における抗菌物質産生は、環境条件によって変動する他、全ての物質が同時に産生されることはない。一部の抗菌物質間については互いの生合成を抑制する調節機構が判明している。本研究では両種におけるそれぞれの抗菌物質産生能が他の表現形質に与える影響を解析した。その結果、特定の抗菌物質産生能の欠失が他の抗菌物質産生能を含む様々な表現形質の発現に影響を与えており、特定の二次代謝産物産生能が相互的に調節し合っていることが分かってきた。細菌の二次代謝産物はスクリーニングの経緯等から抗菌物質や毒素として見出されてきたが、その多くは本来の生理的役割、生合成能力の獲得や進化的経緯などが明らかになっていない。人間の農業活動において有益な存在である植物保護細菌における二次代謝産物産生能の役割について検討してみた。

P2-58

木喰いガニ消化管の微生物群集構造解析 —リグニン・セルロース分解機序の解明—

○馬場 保徳¹, 後藤 暢宏¹, 楠部 孝誠¹, 河井 重幸¹, 三宅 克英^{1,2}

¹石川県立大学・生物資源研, ²名城大・理工

E-mail: ybaba@ishikawa-pu.ac.jp

【背景・目的】

セルロースおよびリグニンは、地球上に最も多く存在する天然高分子であり、難分解性である。とくに、嫌気下では分解され難く、これらを含む紙類や野菜残さの可溶化が、メタン発酵の課題として残されており、効果的な前処理法の開発が望まれている。そこで私たちは、メタン発酵前処理への応用を旨として、落ち葉・木片を食べるアカテガニの消化管に着目し、そのリグニン・セルロース分解酵素活性および消化管細菌の群集構造を解析してきた。本発表では、あらたに解析した消化管真菌の群集構造解析の結果をあわせて、アカテガニにおけるリグニン・セルロース分解機序を考察したい。

【方法】

微生物群集構造解析は、カニの消化管内容物から DNA を抽出し、16S rDNA および ITS 領域を増幅した後、次世代シーケンサー Miseq に供した。得られた配列情報は QIIME software により解析した。セルロースおよびリグニン分解微生物の分離は、好気もしくは嫌気条件下にて、CMC - congo red およびリグニン試薬を寒天培地に添加し、これらにハロが形成されることを指標に実施した。

【結果・考察】

消化管細菌および真菌の群集構造解析の結果、リグニンおよびセルロース分解性好気性真菌と、セロビオース、単糖および芳香族化合物を利用する好気性細菌が検出され、嫌気性微生物はほとんど検出されなかった。一方、別稿で報告した宿主の RNA-seq の結果、宿主自身もリグノセルロース分解に関与することが示唆された。以上より、カニ消化管内では、宿主自身の酵素および好気性真菌によりリグノセルロースの分解がおき、細菌はその分解物を利用しているものと考えられた。また、群集構造解析の情報に基づき、好気性培地を用いることで、本研究で検出されたリグノセルロース分解性真菌を分離することにも成功した。一方、分離源が消化管にもかかわらず、嫌気性リグノセルロース分解微生物はまったく分離されず、この結果は次世代シーケンスで得た解析結果と矛盾しなかった。今後は、本研究で得られた集積培養および分離株を、メタン発酵前処理に利用し、リグノセルロースからのメタン発酵効率化を旨とする。

P2-59

ヤマトシロアリ腸内に共生する原生生物の多様性と機能の解析

○西村 祐貴, 佐藤 渚, 大熊 盛也

理研・BRC

E-mail: yuki.nishimura@riken.jp

シロアリの腸内には多種多様な細菌・古細菌・原生生物からなる複雑な微生物叢が存在しており、シロアリの生存に必須の役割を果たしていることが古くから知られている。しかし腸内を構成する微生物のほとんどは培養することができないため、その詳細な機能については未解明である。近年になって一部の細菌種では培養を介さない実験手法によってゲノムが解読され、窒素固定やアミノ酸合成、還元的酢酸生成を通して共生系に貢献していることが示された。しかし腸内微生物叢の体積の大半を占める原生生物については、個々の微生物種の機能はもとより、その集団構造も不明瞭であるのが現状である。

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* は日本国内に広く分布するシロアリ種であり、形態に基づく分類により 13 種の原生生物が報告されている。しかし分子配列を使った現代的な手法による研究例が少なく、腸内原生生物の多様性は過小評価されているだろうと予測されている。そこで我々はヤマトシロアリにおける腸内原生生物叢の全体像を明らかにするために、アンプリコンシーケンスやシングルセル PCR、シングルセルトランスクリプトームから得られたデータを用いて、群集構造解析と系統解析を行なった。その結果、幾つかの形態種が複数の phylotype を含むことや、属レベルでの分類の見直しが必要であることが判明した。現在はヤマトシロアリ腸内原生生物の全 phylotype に対して、シングルセルまたは数個の細胞を出発材料としたトランスクリプトームを行うことを目指して研究を進めている。発表ではその進捗と、これまでに明らかとなった個々の原生生物の機能を報告する予定である。

P2-60

RNA-seq データが示す共生状態への移行に伴う褐虫藻の変化
— 光合成・アンモニア利用効率UP —

○湯山 育子, 宇川 尚登, 小林 祐介, 橋本 哲男

筑波大・生命環境

サンゴ-褐虫藻の共生のメカニズムは、サンゴの白化現象にも関連するため多く研究されている。しかし、その共生が成立する際の褐虫藻側の変化についてはほとんど分かっていなかった。本研究では、サンゴ-褐虫藻共生系の共生が成立する過程において褐虫藻側の変化を明らかにすることを目的として、褐虫藻培養株 *Durusdinium trenchii* のトランスクリプトームデータ（リード）を取得した。培養株由来のトランスクリプトームデータと、*D. trenchii* がサンゴに共生した後のトランスクリプトームデータを比較することで、褐虫藻が非共生状態から共生状態へ移行する際の遺伝子発現変化を捉えた。

まず、*D. trenchii* の培養株から RNA を抽出し、RNA-seq (HiSeq4000 生物技研で実施) を行い、*D. trenchii* 由来の遺伝子配列セットを得た。その際、HiSeq により得られたリードをアセンブルし、タンパク質コード領域をもつ配列を得た後、既存の褐虫藻由来の配列と高い相同性をもつ遺伝子を抽出した。その結果、25,069 個の遺伝子配列が *D. trenchii* 由来と推定された。さらに培養株由来のリード、サンゴ共生体由来のリードをそれらの遺伝子配列にマップし、各配列のそれぞれの条件（培養株と共生体）における発現量を推定した。edgeR による検定 (FDR < 0.05) の結果、共生開始後 20 日目の共生体で、発現上昇する遺伝子が 395 個、減少する遺伝子が 1,108 個得られた。変動する遺伝子が多いため、発現変動の程度で順位付けし、その上位に該当する遺伝子にまず注目した。発現上昇する遺伝子のうち、上位 1% 以内には、光合成系のタンパク質やアンモニア輸送体が複数検出され、発現減少する上位 1% 以内には、アクチンや熱ショックタンパク質が検出された。現在、オリジナル RNA-seq データをブートストラップリサンプルしたデータセットをもとに、より詳細な統計解析を進めている。本発表ではそれらの結果を含めて報告する。

P2-61

DPANN 群に属す新奇好熱好酸性アーキアの性状およびゲノム解析
～複数種の宿主に依存するナノサイズのアークア～○酒井 博之^{1,2,3}, Naswandi Nur⁴, Antonius Suwanto⁴, 加藤 真吾¹, 伊藤 隆¹, 大熊 盛也¹, 黒沢 則夫³¹理研・BRC, ²学振・特別研究員PD, ³創価大・理工, ⁴ボゴール農科大・数理科学

E-mail: hiroyuki.sakai.vs@riken.jp

近年、ゲノム配列情報に基づいた系統解析により、アーキアの暫定的な新門が次々と提唱されている。なかでも DPANN 群に属するアーキアは、細胞およびゲノムサイズが小さく、増殖するために必要な多くの遺伝子を欠く事から、宿主に依存して生育する共生性アーキアであると考えられている。実際に、本群に属す Nanoarchaeota 門のアーキアは（ナノアーキア）、単独では増殖せず「特定の宿主」の細胞にびっしりと張り付き増殖する。ナノアーキア以外の DPANN 群では、Micrarchaeota 門または Parvarchaeota 門に属すアーキアの培養報告が 3 件ある。しかしながら、再現性のある継代培養ができない為に、多くの性状が未だ謎に包まれている。我々は、Micrarchaeota 門に属する新奇アーキアを、高密度かつ再現性よく継代培養する事に成功した。本発表では、この新奇アーキアが「複数種」の宿主に依存して生育する共生性アーキアであることを報告する。インドネシアで採取された酸性温泉試料を MBSY 培地に植菌し、好気条件下で集積培養を行ったところ (65°C, pH 3.0)、培養液中に Micrarchaeota 門に属す新規アーキアと、2 種の既知好熱好酸性アーキアが確認された。本集積培養液を元にして、最終的に Micrarchaeota 門アーキア (ARM-1 株) と Metallosphaera 属アーキア (AS-7 株) が高度に集積された共培養系を構築した。この共培養系を用いて、ARM-1 株の培養性状、細胞形態、宿主範囲について調査した (両株の増殖は定量 PCR により測定した)。ARM-1 株は直径約 300 nm の極小球菌であり (生育温度: 50 ~ 75°C, 生育 pH: 1.5 ~ 4.5)、酵母エキスなど 4 種の複合基質または 2 種の糖を含む培地、さらには有機物の代わりに単体硫黄や黄鉄鉱を加えた無機培地でも増殖した。ARM-1 株の細胞のみを集め、AS-7 株とは別の 7 属 9 種の好熱好酸性アーキアと共培養したところ、3 属 4 種が ARM-1 株の増殖を支持できる事が確認された。ARM-1 株のゲノムは 814,439 bp と小さく、その特徴はこれまで報告されている Micrarchaeota 門アーキアのゲノムの特徴と概ね一致していた。本研究により、Micrarchaeota 門は自然環境中の様々な種に頼る生存戦略をとる系統である事が示唆された。

P2-62

酸性条件下におけるコエンドロの生育を促進する根部エンドファイト DSE の探索

○赤嶺 真由美, 成澤 才彦

茨大・農

E-mail: akamayum@gmail.com

根部エンドファイト DSE (dark septate endophyte) は、植物に病害を引き起こすことなく、内生する菌類をさす。DSE が内生することにより、植物にストレス（乾燥や病害など）に対する耐性を付与することが知られている (Zhang et al. 2017, Surono & Narisawa 2018)。DSE の効果を利用することにより、作物収穫量を増加させることが期待される。土壌は作物を育てることにより、pH が低くなる傾向がある。酸性条件下では多くの場合、作物の生産量は低下するため、多くの生産者は炭酸カルシウムなどを施用し、土壌 pH を矯正して対応している。本研究では、ハーブとして世界的に利用されているコエンドロ *Coriandrum sativum* (以下、パクチー) の生育を酸性条件下で促進する DSE の探索をおこなった。パクチーの最適な土壌 pH は 6.3 とされている (Sharma et al. 2014)。そこでまず茨城県内で栽培されているパクチーの酸性耐性を調べるため、塩酸によって pH 3-6 に振り分けた培地（無機窒素のみ）上でパクチーを 2 週間生育させ、各 pH の地上部と根部の乾燥重量を測定した。その結果、地上部、根部でそれぞれ、pH 5.4 と 5.2 で最大の平均乾燥重量が得られた。次に、培地に植物が直接利用できない有機窒素肥料を混合することにより、酸性条件 pH 4.0-4.4 を設定し、DSE を培養した。DSE は、茨城大学微生物学研究室の DSE コレクションからランダムに選んだ 10 種 18 菌株を用いた。2 週間培養した DSE 培地に、発根させたパクチー種子を置いて、2 週間生育させて地上部乾燥重量を測定した。その結果、*Cladophialophora* 属の 1 種 4 菌株が上位を占め、次いで *Veronaepsis* 属の 1 種 1 菌株、*Exophiala* 属の 3 種 3 菌株と *Helminthosporium* 属の 1 種 1 菌株の順で、対象区に比べて地上部乾燥重量が有意に増加した。DSE 処理区のすべてで培地の pH は対象区に対して有意に増加していた。上記 9 菌株中 7 菌株では pH 5.5-6 であり、その平均乾燥重量は、無機窒素のみの培地 pH 5.4 で得られた最大平均乾燥重量の約 1.1-1.4 倍となった。

P2-63

共生細菌のゲノム縮小進化を駆動する要因

○金城 幸宏, Bourguignon Thomas

沖縄科学技術大学院大学

E-mail: yukihiko.kinjo@oist.jp

内部共生において、共生関係の偏性化に伴い共生細菌は普遍的に大規模なゲノムの縮小進化を経験する。共生細菌における縮小ゲノム進化を説明する仮説は、1) 集団構造の変化に由来する遺伝的浮動の効果、2) 突然変異率の増加、3) 細胞内環境への適応、の 3 つに大別される。これらの要因を識別する際には主に、ゲノム間で比較可能な全ての遺伝子について、作用する純化選択圧並びにその分布を系統間で比較することにより、どちらがより支配的であるかを推定するのが一般的である。しかしながら、これまでの先行研究においては利用可能なゲノム情報が限られており、統計的に十分な因果推論を行うことが難しいことから上記の諸要因を包括的に検証するような研究はなされてこなかった。本発表では近年のゲノム科学の発展に伴い拡大してきたゲノムデータベースの情報を利用することで、共生細菌ゲノムにおける置換率や選択圧などの各種進化パラメータを推定し、共生細菌種内ならびに種間で比較することで既存の仮説の妥当性について検証した。その結果、これまで広く支持されてきた遺伝的浮動の効果は限定的であり、突然変異率の増加が最も支配的にゲノム縮小進化に寄与していることが示唆された。

P2-64

メタノールに依存しないメタン酸化細菌と非メタン酸化細菌の クロスフィーディング

○竹内 美緒¹, 尾崎 遼², 平岡 聡史³, 鎌形 洋一¹, 坂田 将¹, 吉岡 秀佳¹, 岩崎 渉⁴

¹産業技術総合研究所, ²筑波大学, ³JAMSTEC, ⁴東京大学

地球温暖化ガスであるメタンの大気中濃度は増加し続けており、自然界における挙動や、それに関わる微生物活動の解明は重要である。一般的に、メタンは環境中でメタン酸化細菌により酸化され、メタン酸化細菌が排出するメタノールをメタノール酸化細菌が利用し(クロスフィーディング)、さらに排出された物質やバイオマスを従属栄養細菌が利用する、と考えられている。我々は海底堆積物からメタン酸化細菌である *Methylocaldum marinum* S8 と通性メチロトロフである *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4 を分離した。これら 2 株はメタンのみを炭素源として安定した共培養系を構築したことから、詳細な共生機構の解明を試みた。共培養系において Gela4 株の RNA-seq 解析を行ったところ、acetyl-CoA synthetase や TCA サイクルに関わる遺伝子の発現がメタノールでの単独培養時に比べ増加した。また、S8 株の単独培養時、共培養時いずれにおいてもメタノールは検出されず (<310 nM)、酢酸が排出されていた (< 16 μM)。Gela4 株の acetyl-CoA synthetase と serine pathway 遺伝子である hydroxypyruvate reductase の発現量比を調べたところ、Gela4 株をメタノールあるいは酢酸で単独培養した際にはそれぞれ 0.2、5.3 であり、共培養系においては増殖前期、後期で 7.9、6.8 と酢酸での単独培養時の値に近かった。以上より、S8 株と Gela4 株の共培養系では、従来考えられてきたメタノールではなく、酢酸がクロスフィーディング物質になっていると考えられた。このような「メタノールに依存しないメタン酸化細菌と非メタン酸化細菌のクロスフィーディング」が環境中のメタン酸化においてどの程度寄与しているのか、今後明らかにする必要がある。

<文献>

Takeuchi M. et al. 2019. Possible cross-feeding pathway of facultative methylotroph *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4 on methanotroph *Methylocaldum marinum* S8. PLoS ONE 14(3): e0213535.

P2-65

落葉分解のホームフィールド・アドヴァンテージと土壤微生物群集の固有性の 時間的変化

○執行 宣彦¹, 梅木 清², 平尾 聡秀¹

¹東大・秩父演, ²千葉大・院園芸

E-mail: shigyo@uf.a.u-tokyo.ac.jp

落葉分解は森林生態系の炭素循環の起点となる重要なプロセスである。これまで、落葉分解率は気候と落葉の質によって決まると考えられてきたが、分解率には高い変動性があり、分解者である微生物群集を考慮する必要性が指摘されている。近年、落葉分解におけるホームフィールド・アドヴァンテージ (HFA) と呼ばれる現象により、落葉分解率がよく説明できることが指摘されてきた。HFA は、ある場所の落葉を別の場所の樹木の下に移したとき、分解率が著しく低下する現象であり、その場所の環境に固有な微生物群集の存在によって起こる可能性がある。本研究では、1) 落葉分解には HFA が存在しており、2) HFA は微生物群集の固有性によって説明され、3) HFA の効果は落葉分解の初期よりも中期以降で強くなるという仮説を立て、検証することを目的とした。

東京大学秩父演習林の天然林において、コメツガの優占する高標高地 (1800 m) とイヌブナの優占する低標高地 (900 m) の間で、土壌とリターバッグの相互移植実験を行った。この実験により気候と土壌の環境がホームであるときに、落葉分解が促進しているかどうかを検証できる。2016 年 7 月に移植実験を開始し、117、376、527 日後に土壌とリターバッグを回収した。各土壌及びリターについて、真菌類の rDNA ITS 領域と真正細菌の 16S rRNA 遺伝子部分領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析と定量 PCR を行った。

本研究の結果、コメツガとイヌブナの落葉分解が、ホームの気候ではなく、ホームの土壌で促進され、ホームの土壌の効果は埋設日数とともに強くなることが明らかになった。各リターの微生物の多様性・DNA コピー数・群集構造は由来の土壌と似ており、落葉の微生物群集は土壤微生物群集をよく反映していた。また、ホーム土壌には固有な微生物群集には *Penicillium* 属や *Streptomyces* 属などの抗生物質を生産する微生物が含まれ、ホームの土壌に固有な微生物群集の相対優占度は落葉分解率を説明することが明らかになった。これらの結果は、ホーム土壌に固有な微生物群集が落葉分解を促進するという HFA 仮説を支持した。また、直接的に落葉分解に関与する微生物だけでなく、抗生物質生産などにより間接的に関与する微生物の存在によっても HFA が引き起こされることも考えられた。発表ではさらに、相互移植実験の経過日数に応じた、固有な土壤微生物群集とリター形質、土壌特性の関係についても議論する。

P2-66

土壌微生物の群集構造を数理で読み解く

島田 尚^{1,2}, 美世 一守^{3,4}, ○大塚 重人^{4,5}¹東大数理情報, ²東大院工, ³東大院理, ⁴東大院農, ⁵東大CRIIM

【目的】近年、次世代シーケンサーを用いた大量の塩基配列データにより、土壌微生物の群集構造を詳細に調べることが可能になった。その複雑な群集構造データをいかにして表現すれば、生態学的な知見・仮説を得ることができるのだろうか。本発表では、数理的な評価を加え可視化の方法を工夫することによって、群集構造やその変遷に見られる特性を明らかにする。

【方法】黒ぼく土に炭素源や窒素源を添加し、継時的にとられた細菌群集構造データ（16S rDNAのアンプリコン解析）を用い、土壌の群集構造間の類似度を、相対種個体数（Relative Species Abundance, RSA）の「ランクサイズ関係」および「順序構成」に注目して評価した。

【結果】まず、炭素源や窒素源を添加しないコントロール土壌の細菌群集構造において、RSA分布が冪（べき）や対数正規分布で特徴づけられる幅の広い（多様性の高い）特有の形状を共通に呈することが分かった。コントロール土壌間でのRSA分布の類似性は非常に高い。この共通形状を基準とすると、炭素源や窒素源の添加を行った後の土壌では、相対存在量の上位10位程度までのOTUが卓越する方向にRSA分布形状が大きく変化した。またこの分布のゆがみは、時間の経過とともにコントロールで見られた分布形状に回復する傾向が認められた。一方で、各土壌でのOTU存在量の順序に注目すると、添加後のRSA分布のゆがんだ状態においても順序構成の変化は少ないことも分かった。順序構成の変化が大きいのはむしろこれに続くRSA分布形状の復元期であった。

以上のように、OTU存在量のバランスと順序構成とを分離した非線形なデータ解析から、土壌細菌の群集構造が示す頑健性と可塑性の両側面を評価できることが示された。

P2-67

根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* Y34 のトマト根部微生物叢への時空間的な影響○野口 愛¹, 高田 圭太², 橋本 実佳¹, 松下 紗季¹, 坂上 伸生¹, 郭 永¹, 西澤 智康¹, 太田 寛行¹, 成澤 才彦¹¹茨大・農, ²茨大・iFC

E-mail: mana.noguchi.mesc@vc.ibaraki.ac.jp

【背景】近年、植物内部に共生することで宿主に成長促進など正の効果をもたらす菌類（エンドファイト）の農業利用が注目されている。例えば、*Veronaeopsis simplex* Y34 をトマト根部にエンドファイティックに定着させることで、ポット栽培したトマトの果実収量が向上し、その際に根圏や根内の微生物叢が変化することが報告された（Guo et al, 2016）。本研究では、*V. simplex* Y34 を定着させたトマトをハウス内で栽培し、トマト根圏や根内、また周辺土壌の微生物叢の時空間的な変化を解析した。

【方法】実験室にて調製した *V. simplex* Y34 資材と有機栽培用培土（有機の土、サカタのタネ）を10%（v/v）にて混合し、トマト（ロソナポリタン、パイオニアエコサイエンス）を2018年3月23日に茨城大学農学部附属国際フィールド農学センターの育苗用ハウス内にて播種し、*V. simplex* Y34 のトマトへの定着を行った。同年4月25日に鉢上げ後、5月1日に栽培用ハウスへの定植を行い、栽培を継続した。5月1日、5月28日、6月24日に処理区・対照区各3本の植物体を回収し、ハウス土壌と根部・根圏土壌の微生物叢解析（細菌16S rRNA遺伝子V3/V4領域、菌類ITS1領域）を行った。根部試料は直径に応じ2種類（約1 mm未満、1 mm以上）、根圏試料も根部からの距離に応じ2種類（tight, loose）に分け、局所的な微生物分布の把握を試みた。

【結果・考察】定植時の *V. simplex* Y34 のトマト根部への定着率（再分離率法）は77%であり、トマトへの高い定着が確認された。各試料のoperational taxonomic unit (OTU) 構成を非計量多次元尺度構成法にて解析したところ、菌類叢は処理区・対照区間で大きく分かれており、*V. simplex* Y34 が優占することによる影響が大きく示された。しかしその影響は時間経過とともに小さくなり、両区の菌類叢の類似度が増していった。一方、細菌叢はハウス土壌・根部・根圏土壌といった試料間差が大きく、処理区・対照区間の差は小さかった。また、時間が経過しても異なる試料間の微生物叢の類似度は変化しなかった。以上より、ハウス栽培においてトマトに *V. simplex* Y34 を処理することにより根圏や根内の微生物叢が変化した。特に菌類は生物的そして時間的な影響が、細菌は空間的な影響が大きいことが示唆された。

P2-68

ダイズの根近傍領域における微生物叢の動態解析

○山崎 真一¹, 青木 裕一¹, Hossein Mardani Korrani², 海田 るみ², 藤井 義晴², 小林 優³, 杉山 暁史³

¹東北大 ToMMo, ²東京農工大, ³京都大

E-mail: yamazaki.shinichi@megabank.tohoku.ac.jp

根圏 (Rhizosphere) は「植物の根から影響を受ける根のごく近傍の土壌領域」と定義される。根圏は植物の養分吸収や微生物との相互作用が起こる、植物の健全な生育にとって重要な領域である。根圏では根からの光合成産物の分泌や特定の微生物の繁殖が活発になるなど、非根圏 (バルク土壌) とは異なる特異な環境が形成されていると考えられている。その重要性にもかかわらず、根圏環境の成立に寄与する植物微生物間の相互作用分子や、植物体の生長に伴う微生物叢の変遷は未解明な点が多い。本研究ではダイズ (*Glycine max*) を対象とし、バルク土壌、根圏、根面 (Rhizoplane)、根内 (Endosphere) の 4 つの根近傍領域について、微生物叢の継時的変化を解析した。

栽培は、2018年に東京農工大学農学部附属の研究圃場で行い、6月上旬にダイズを播種したのち計4回 (7/4, 7/18, 8/1, 8/21) 試料を採取した。ダイズの根が及ばない範囲の土壌をバルク土壌、引き抜いたダイズ根系を空中で穏やかに振とうして大部分の土をふるい落としした後に根の表面に残留した土壌画分を根圏と定義した。また、根を緩衝液に浸して超音波処理し遠心分離で得られた土壌画分を根面と定義し、各土壌画分および根 (根内) からDNAを抽出した。微生物プロファイルは16S rRNA 遺伝子のV4領域をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析で推定した。

α 多様性を表す shannon 指数は、バルク土壌と比べて根圏、根面、根内では有意に低く、根近傍では特定の微生物が繁殖することが示唆された。また、 β 多様性の指標として Weighted UniFrac 距離を用いて主座標分析を行った結果、根圏、根面、根内ではサンプリング時期により群集構造が明確に分離したが、バルク土壌では時系列による分離はみられなかった。Phylum レベルでの微生物の相対頻度の解析の結果、バルク土壌、根圏、根面では Proteobacteria が全ての時点で最も優勢であり、根内では生育初期 (7/4) は Actinobacteria が優勢であったが後期 (8/21) には Proteobacteria が優勢となった。また、バルク土壌では Phylum レベルの微生物頻度に大きな継時的変動はみられなかったが、根圏、根面、根内では生育段階によって頻度分布が異なっていた。以上の結果から、バルク土壌と比べて根近傍領域ではダイズの生育に伴い微生物叢が大きく変化することが示唆された。

P2-69

伝統農法“ネギ類の混植・輪作”による土壌伝染性植物病害抑制機構を微生物生態学的視点から紐解く

○西岡 友樹^{1,2}, Malek Marian², 小林 一成³, 小林 裕子³, 山本 京祐¹, 玉木 秀幸¹, 須賀 晴久⁴, 清水 将文²

¹産総研・生物プロセス, ²岐大応生, ³三重大地域イノベ, ⁴岐大科基セ

E-mail: tomoki-nishioka@aist.go.jp

日本や中国の伝統農法であるネギ類の混植や輪作には、土壌伝染性の植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum* が引き起こすフザリウム病の発生を軽減する効果が知られている。我われは、このフザリウム病抑制現象の原因解明をネギ類の根圏微生物の視点から進めてきた。これまでの研究から、ネギ類根圏に集積する拮抗性グラム陰性細菌がフザリウム病抑制現象の主因であることを明らかにした (西岡ら, 環境微生物合同大会2017)。本研究では、それらグラム陰性細菌群の中でも特に重要な役割を担う細菌群を特定するため、以下のような実験を行った。

まず、Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析によりネギ類 (ネギおよびタマネギ) とキュウリの根圏細菌叢の属構成を比較したところ、グラム陰性細菌の *Flavobacterium* 属細菌がネギ類根圏に特徴的な優占細菌群であることが明らかとなった。そこで、*Flavobacterium* 属細菌用の半選択培地 (PSR2A-C/T 培地) (Nishioka et al., 2016, Microbes and Environments) を用いて同細菌をネギおよびタマネギの根圏から 19 菌株分離し、キュウリつる割病 (病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*; 以下, Focu) に対する抑制効果をキュウリ幼苗試験で評価した。その結果、分離細菌株はいずれも同病を顕著に抑制する能力をもつことが明らかとなった。さらに、*Flavobacterium* 菌株を接種した土壌中における Focu の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、Focu の胞子発芽および菌糸伸長が顕著に抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、ネギ類の混植・輪作によるフザリウム病抑制効果には、ネギ類根圏由来の拮抗性 *Flavobacterium* 属細菌が重要な役割を果たしていることが示された。

P2-70

網羅的なロドプシン系統解析から理解する微生物の進化と生態

○西村 陽介¹, 吉澤 晋^{1,2}

¹東大・大海研, ²東大・院新領域

E-mail: ynishimura@aori.u-tokyo.ac.jp

微生物はロドプシンを光受容体として光エネルギーを利用する。微生物型ロドプシンは細菌・古細菌・真核生物・ウイルスの多くの系統群に分布しており、光がほとんど届かない深海を含む、多様な環境下における微生物から発見されている。環境微生物がロドプシンによって受け取る光エネルギー量は光合成系に匹敵すると推定されており、ロドプシンによる光利用が微生物生態系へ与える影響は極めて大きい。微生物型ロドプシンの生物化学的機能は、主に分離株のロドプシン遺伝子を大腸菌等において異種発現させることによって調べられてきた。これまでの研究から、H⁺ポンプ、Na⁺ポンプ、Cl⁻ポンプ、イオンチャネル、光センサー／酵素共役型と多様な機能を持つことが知られている。一方で、ロドプシンは極めて大きな配列多様性を持つため、機能未知のロドプシンも依然として多い。特に近年、次世代シーケンサーによって読まれた大量のゲノム配列情報の蓄積によって、環境中に存在する未分離の微生物についての知見は爆発的な広がりを見せているが、そこには、配列新規性が高く機能が推定できない未知ロドプシン遺伝子が大量に存在する。そこで我々は、海水・淡水・高塩環境のみならず、これまであまり探索されていない土壌、永久凍土、温泉、腸内環境等の様々な環境のメタゲノム配列からロドプシン遺伝子を探索し、今までに報告がない規模での遺伝子系統解析を行うことで、ロドプシンの系統関係を網羅的に把握した。その結果、多くの新規ロドプシン系統群が見出された。また、この系統解析結果を用いて、各環境におけるロドプシンの系統プロファイリングを行うことにより、ロドプシンの遺伝子進化と、微生物のロドプシンを用いた環境への適応について、生物化学的機能・環境特異性・遺伝子水平伝播等の観点で論じる。

P2-71

Evidence of microbial CH₄ production in surface water and surface sediment during cyanobacterial bloom in Lake Suwa

○Makoto Matsushita¹, Yoshinori Takano², Hiroyuki Imachi², Atsushi Urai^{2,3}, Ho-Dong Park⁴, Hiroki Iwata⁴, Naohiko Ohkouchi²

¹AIST, ²JAMSTEC, ³Dept. Science and Technology, Grad. Sch. of Medicine, Science and Technology, Shinshu Univ.,

⁴Dept. Environ. Sciences, Faculty of Science, Shinshu Univ.

E-mail: m-matsushita@aist.go.jp

Methane (CH₄) is an important greenhouse gas and contributes substantial budget to global warming. Freshwater lakes are identified as one of the main CH₄ sources, as it is estimated that they contribute to 6-16% of natural CH₄ emissions [1]. The main part of CH₄ released from lakes is considered to be produced by methanogenic archaea in anoxic sediments as terminal step in the degradation of organic matter. Microbial CH₄ production is still regarded by many as a process limited to anoxic environments. Nevertheless, over the past few decades, increasing evidence of CH₄ accumulation in oxygen-saturated lake surface water has emerged [2]. Oxic CH₄ peaks have been found to be closely associated with phytoplankton dynamics across multiple lakes. Additionally, some studies suggest the presence of a CH₄ production process by methanogenic archaea associated with cyanobacteria [3][4]. However, it is unclear whether the CH₄ production is taking place in actual environments. In this study, we investigated microbial CH₄ production in surface water and surface sediment of Lake Suwa in Nagano Prefecture, Japan based on the analyses of genes (16S rRNA genes and *mcrA* genes) and Coenzyme F430 (a biomarker for methanogenic archaea) [5][6]. Especially, we focused on cyanobacterial bloom and tried to identify a CH₄ production process by methanogenic archaea associated with cyanobacteria. Our results suggest the presence of CH₄ production processes by methanogenic archaea in surface water as well as surface sediment during cyanobacterial bloom in Lake Suwa. References: [1] Bastviken et al., Global Biogeochem. Cycles, 18, GB4009 (2004). [2] Tang et al., Environ. Sci. Technol. Lett., 3, 227-233 (2016). [3] Grossart et al. PNAS, 108, 19657-19661 (2011). [4] Berg et al. World J. Microbiol. Biotechnol., 30, 539-545 (2014). [5] Kaneko et al., Anal. Chem., 86, 3633-3638 (2014). [6] Kaneko et al., Geochim. J. 50, 453-460 (2016).

P2-72

アマモ葉表面に形成されたバイオフィーム内の微生物群集構造の解析

○土屋 雄揮, 村中 優紀, 中川 達功, 高橋 令二

日大・生物資源

【目的】アマモは海中に見られる水生植物で、沿岸域で群落を形成し、生物多様性や水質の維持に貢献していると言われている。近年、アマモの生長に、アマモの葉表面に形成されるバイオフィーム（以下、BF）が影響を与えていることが解ってきた。しかし、BF内の微生物の種類や機能についてはまだ十分な知見は得られていない。そこで本研究では、アマモの葉表面のBF内の微生物群集構造を調べ、微生物とアマモの生長との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】日本大学生物資源科学部下田臨海実験所付近のアマモ群落から、アマモの葉表面に形成されたBFを採取し、DNAを抽出した。抽出したDNAを用いてNextera DNA Library Prep Kitで解析用のライブラリーを作製し、MiSeq V2 reagent kitを用いてMiSeqでショットガンメタゲノム解析を行った。得られた塩基配列をLocal BLASTによる相同性検索に供した（e-value 10^{-15} 以下で検索）。

【結果および考察】16S rDNAのデータベースで検索したところ、約1,700 readsについて結果が得られた。20門445属が検出され、Proteobacteria門（28.9%）とCyanobacteria門（26.0%）で過半数が占められていた。Proteobacteria門では、Alpha-proteobacteria綱のRhodobacterales目とGamma-proteobacteria綱のChromatiales目、Oceanospirillales目、およびCellvibrionales目が多く見られ、光合成細菌や窒素固定能を持つ種類が検出された。Cyanobacteria門では、綱や目レベルでは未分類のものが多かったが、ポリヒドロキシ酪酸（PHB）生産能を持つ*Neosynechococcus*属や窒素固定能を持つ*Oscillatoria*属などが検出された。藻類の18S rDNAの検索では、約3,400 readsの結果が得られた。9門295属が検出され、Stramenopiles（71.0%）が過半数を占めており、*Saccharina*属や*Nannochloropsis*属などが多く見られた。また、Chlorophyta門（13.7%）の*Prototheca*属も比較的多く見られた。これらは、多糖や脂肪酸を生産する種として知られている。他にも窒素固定能を持つもの、生理活性物質を生産することで知られる藻類などが検出された。光合成や窒素固定により貧栄養な海水中でも栄養が供給され、有機物の生産や分解、BFの形成が可能になっていることが考えられた。発表では群集構造解析の結果をもとに微生物とアマモの生長との関係について考察する予定である。

P2-73

微生物の生き残り戦術に使われる特殊環状ペプチドの生合成機構をタンパク質立体構造から探る

○澄田 智美^{1,2,3}, Svetlana Dubiley⁴, Brendan Wilcox⁴, Konstantin Severinov^{4,5}, 田上 俊輔^{2,3}¹海洋研究開発機構 (JAMSTEC), ²理研CLST, ³理研BDR, ⁴Russian Academy of Science, ⁵Waksman Institute for Microbiology

E-mail: sumidat@jamstec.go.jp

ラッソペプチドは約20アミノ酸からなる特徴的な投げ縄構造を持つペプチドで、系統的に近縁な微生物の増殖を阻害する抗微生物ペプチドとして生産されている。特に微生物が貧栄養環境に置かれた際に多く発現し、栄養物を巡る競争で有利に働く微生物の生き残り戦術の一つと考えられている。RNAポリメラーゼ等の酵素を阻害する抗微生物活性以外にも、抗HIV活性や受容体のアンタゴニストなどの生理活性も報告されており、ペプチダーゼや熱に対して耐性を示すため、ペプチド創薬への応用も期待されている。

ラッソペプチドは翻訳後修飾ペプチド (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs)) の一種で、N末端の7-9アミノ酸で環状構造を形成し、C末端側がその環の中を通り抜ける特殊な投げ縄構造をしている。このような投げ縄構造の形成には、リーダーペプチドとコアペプチドから成る前駆体ペプチド (LasA) と、ラッソペプチド合成酵素群 (LasB1, B2, C) と呼ばれる一連の酵素が必要である。LasB1がリーダーペプチド認識タンパク質、LasB2がリーダーペプチド切断酵素、LasCがコアペプチドの環状構造形成酵素である。これらの酵素群の活性に重要な触媒残基は、酵素学的な検討から同定されているが、構造解析の研究は進んでおらず、詳細な反応機構は未だ解明されていない。そこで本研究では、酵素の作用機構を視覚的に捉えることのできるタンパク質のX線結晶構造解析を手法とし、ラッソペプチド生合成機構の解明を試みた。

今回はラッソペプチド生合成経路の第一段階であるLasB1のリーダーペプチド認識機構に関して報告する。我々は*Thermobifida fusca*のLasB1とリーダーペプチドの複合体の構造を、世界に先駆けて高分解能で明らかにした。LasB1の立体構造は、他の様々なRiPPsのリーダーペプチド認識を担っているRiPP recognition elements (RREs) と良く似たwinged helix-turn-helix構造を持っていたが、リーダーペプチドの認識様式は、既報のRREsによる標的ペプチドの認識様式と様々な部分で異なっていた。例えば、リーダーペプチドはLasB1のN末側のanti-parallel β -sheetの一端に、 β -sheetを一本付加する形で結合していた。さらに構造情報からリーダーペプチドの認識に重要なアミノ酸を同定し、その特徴が広範囲の微生物種間で保存されていることを、*Bacillus pseudomycoloides*のLasA, B1, B2を用いた点変異体分析から明らかにした。

P2-74

世界各地のメタゲノム解析で解明する氷河シアノバクテリアの多様性

○村上 匠¹, 瀬川 高弘², 広瀬 侑³, 森 宙史¹, 竹内 望⁴

¹遺伝研, ²山梨大 総合分析実験センター, ³豊橋技科大 応用化学・生命工学系, ⁴千葉大 院理

氷河表面で繁殖する糸状シアノバクテリアは、周囲の鉱物や有機物を巻き込みながら凝集することで、「クリオコナイト」と呼ばれる泥粒子状の構造体を形成する。クリオコナイトは、氷河表面における代表的な一次生産の場であるとともに、多様な従属栄養生物を育む場でもあるため、まさに氷河生態系の基盤的存在といえる。近年、クリオコナイトを構成するシアノバクテリアの系統組成が、地域間、特に極域とアジア高山域とで大きく異なることが明らかとなっており、地球規模での氷河シアノバクテリアの多様な生態に注目が集まっている。しかし、氷河は生物学的調査が容易でない地域に位置することも多く、広範な地域間で氷河シアノバクテリアのゲノム情報や生理機能を実際に比較した研究例は乏しい。そこで我々は、両極域やアジア高山域など世界各地の様々な氷河環境からクリオコナイト試料を収集し、培養を介さないメタゲノム解析を駆使することで、氷河シアノバクテリアの種構成や遺伝子機能の地域間差異を調査した。シアノバクテリアの系統組成を解析した結果、アジアでは極域に比べより多様なシアノバクテリア種がクリオコナイト内に生息していることが明らかとなった。さらに、シアノバクテリアの光受容体関連遺伝子の組成を調べた所、北極域ではシアノバクテリア共通の赤色光吸収タンパク質であるフィコシアニンとアロフィコシアニンの遺伝子のみをもつ系統が優占していた。一方アジアのクリオコナイトでは、それら色素タンパク質に加え、より短波長の緑色光を吸収するフィコエリスリンや、それらの量比を調節する光受容体の遺伝子をもつ系統が優占していた。これらの結果から、極域とアジアでは、シアノバクテリアの光環境へ順化する戦略が異なることが推察された。本発表では、光受容体以外の遺伝子機能の地域間比較解析の結果からも、各地域の氷河シアノバクテリアの生態を議論したい。

P2-75

Microbial communities enriched on conductive metal surfaces at a deep-sea hydrothermal field that potentially involve extracellular electron transfer reactions

○Hiroyuki Kashima, Masahiro Yamamoto, Ken Takai

SUGAR program, JAMSTEC

E-mail: kashimah@jamstec.go.jp

Electrotrophy with extracellular electron uptake from insoluble electron donors such as minerals or syntrophic partner cells have been studied in the interest to better understand microbial ecologies and biogeochemical cycles. Electrotrophic microbial activities have been investigated in laboratory reactors by using electrochemically controlled polarized electrodes as model extracellular electron transfer (EET) substrates, but such microbial activities under natural environments remains virtually unknown. Thus, the present study conducted on-site electrotrophic microbial enrichment experiments with metal electrodes that cathodically polarized by exploiting galvanic corrosion reactions as the stable extracellular insoluble electron donor, in order to explore microbial EET activities under the environment. The enrichment for 24 months at a deep-sea hydrothermal field in Mid Okinawa trough, Japan yielded distinctive bacterial communities that potentially involve EET reactions. Specifically, 16S rRNA gene analysis showed that microbial community on the surface of cathodically polarized electrodes dominated by gammaproteobacteria were different from control metal surfaces or rocks at the same field. Within the community, several abundant OTUs associated with Thiomicrospiraceae, up to 60% of the retrieved sequences from a sample, were potentially associated with electrotrophic reactions. By contrast, non-polarized stainless-steel surfaces (control metal surface) retained sequences associated with neutrophilic iron-oxidizing zetaproteobacteria, Mariprofundaceae, as well as deltaproteobacteria represented by Geobacteraceae within the reddish corrosion product. This suggests that, in contrast to polarized electrodes, microbial activity at the control electrode was supported by iron-oxidizing chemolithoautotrophy. This presentation discusses phylogeny and estimated functions of enriched communities.

P2-76

鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び *Stenotrophomonas maltophilia* 分離株のゲノム特性

○山本 詩織, 朝倉 宏

国衛研・食品衛生管理部

カルバペネム系薬剤は多剤耐性菌感染症治療に用いられる重要な抗菌薬であり、近年ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の感染事例が増加傾向にある。国内における本菌感染症例の多くは院内感染によると目されているが、国外では家畜生産現場や食品からの分離も報告されつつあり、食品を介した同耐性菌の伝播も懸念される。国内では食品由来耐性菌の年次推移を示す報告媒体は存在しておらず、食品中のカルバペネム耐性菌汚染実態並びにその健康影響の多くが未だに不明であることを鑑み、本研究では国内の鶏肉中における当該菌の汚染実態を検討すると共に、鶏肉より分離された *Stenotrophomonas maltophilia* のゲノム特性について解析を行った。

国内に流通する鶏肉 226 検体についてカルバペネム耐性菌分離試験に供した。試料 10g に 4 倍量の 1 μ g/ml セフトキシム加緩衝ペプトン培地を加えて 37°C 24 時間培養後、2 μ g/ml メロペネム加 VRBG 寒天培地を用いて選択分離培養を行った。得られた分離株は菌種同定試験、薬剤感受性試験、カルバペネマーゼ産生遺伝子検出試験に供した。*S. maltophilia* 分離菌株は Ion CHEF/GeneStudio S5 を用いたドラフトゲノム解析に供した。

カルバペネム耐性菌は鶏肉 226 検体中 4 検体 (1.8%) より検出され、*S. maltophilia* 1 株、*Pseudomonas otitidis* 2 株、*P. protegens* 1 株、*P. putida* 1 株の計 5 株が分離された。*S. maltophilia* 株及び *P. otitidis* 株はメロペネムに対する MIC 値が > 64 μ g/ml と高く、それぞれ *bla_{L2}* 又は *bla_{POM}* 遺伝子を保有していた。これらのうち、食品からの分離報告が極めて少ない *S. maltophilia* CRB139-1 株についてゲノム解析を行ったところ、ゲノムサイズは 4,618,049 bp であり、MLST 型別は ST202 に属した。カルバペネム耐性に関わる遺伝的要因である多剤排出ポンプ *SmeDEF* は認められなかった。また、当該菌株はアミノグリコシド系薬剤にも耐性を示したが、ゲノムデータに基づき、当該株は同剤耐性を付与する排出ポンプ *SmeZ* 遺伝子の保有が確認された。

以上より、国内流通鶏肉検体におけるカルバペネム耐性菌汚染率は概して低いと想定されたものの、流通食品への当該菌汚染が今後拡散する可能性も否めない。鶏肉由来 *S. maltophilia* の検出は国内で初めての事例であり、食品を通じた同耐性菌による健康危害性を判断する上では、広範な食品における同耐性菌の汚染実態の探知並びに分離株のゲノム特性解析が有用と考えられる。

P2-77

生活習慣や住居構造が住環境菌叢に与える影響解析

○矢野 剛久¹, 齊藤 加奈², 万条 奈央³, 野田 恵⁴, 青野 恵太⁴, 鈴木 不律⁴, 深井 尚子³, 山本 貴子¹

¹花王 (株)・安全性科学研, ²花王 (株)・ホームケア事業部, ³花王 (株)・生活者研究部, ⁴花王 (株)・ハウスホールド研

E-mail: yano.takehisa@kao.com

【背景と目的】住居構造やそこに住む人々の生活習慣は極めて多様であり、各変動因子によって菌叢は極めて容易に変化する。加えて、日本では他国にない生活習慣や住居構造、家具等が多いことから、家庭内の衛生課題を発見したり、新たな衛生習慣を提案したりする上では国内の家庭環境菌叢の徹底的な理解が欠かせない。そこで、我々は国内の家庭の大規模な菌叢を解析し、生活習慣等との関連性を解析することで、新たな衛生習慣の提案を目指した。【方法】2017 年より 2 年間に亘って 136 家庭、2500 ~ サンプルの解析を行った。解析では、一般生菌数と大腸菌群数の解析に加えて、16S rRNA V3V4 領域情報に基づく次世代シーケンサーによる菌叢解析を行った。また、住居構造や生活習慣に関する情報として 300 ~ 個のメタデータを収集して互いの関連性を解析した。【結果・考察】キッチンからダイニング、リビング、洗面台周辺、浴室等の菌叢を比較したところ、キッチンシンク等の排水溝に加え、キッチンスポンジや台ふきんで有意に菌数が多かった。また、冷蔵庫の野菜室は他の場所と比べて菌数に有意な差は見られなかったものの、菌叢については他の場所と比べて有意に *chao1* 指数が大きく、同箇所にも多様な菌が存在することが示唆された。次に、食品分野で環境衛生度の評価指標として使用される腸内細菌科の分布を解析したところ、キッチンシンクと冷蔵庫の野菜室等で腸内細菌科が多い傾向が確認された。こうした特徴を有する冷蔵庫の野菜室に関して、菌どうしのネットワーク解析を行ったところ、*Rhizobiaceae* や *Pseudomonadaceae* 等、植物や土壌に関係する菌と腸内細菌科との間に関連性が示唆され、野菜由来の土壌細菌として腸内細菌科が野菜室に混入した可能性が考えられた。さらに、腸内細菌科存在比と関連する住環境や生活習慣を解析したところ、ウェットシートの使用、ベタつき等が抽出されたことから、清潔なウェットシートによるベタつきの除去が腸内細菌科の制御手段の一つとして有用である可能性が示唆された。

P2-78

二価鉄およびメタン生成菌の共存によるクロロエチレン類分解細菌 *Dehalococcoides* の多様性への影響

○吉川 美穂, 張 銘, 川辺 能成

産総研・地圏資源

E-mail: m.yoshikawa@aist.go.jp

【目的】地下水・土壌の汚染物質であるクロロエチレン類の浄化対策として、*Dehalococcoides*属細菌等による還元的脱塩素分解を利用したバイオレメディエーションが実用化されつつある。一方、2017年度からは分解産物であるクロロエチレン (VC) も土壌汚染対策法における特定有害物質に指定され、クロロエチレン類の完全分解が求められている。これまで、発表者らは二価鉄やメタン生成菌の共存がクロロエチレン類の完全分解の可否を決定することを示してきた。本研究は、これらの共存がクロロエチレン類分解菌である *Dehalococcoides* の多様性へ与える影響を明らかとすることを目的に行った。【方法】国内の汚染サイトから採取した地下水を用いて、PCEの脱塩素分解実験を行った。二価鉄やメタン生成菌の共存による *Dehalococcoides* の多様性への影響を解明するため、塩化鉄 (II) および2-ブromoエタンスルホン酸ナトリウム (BES) の添加有無を組み合わせた4条件で分解実験を行った。実験はバイアル瓶内で行い、PCE初期濃度は1 mg/Lとした。クロロエチレン類およびエチレン、エタン、メタンをGCおよびGC-MSで経時的に分析した。培養液からDNAを経時的に抽出し、*Dehalococcoides* 16S rRNA 遺伝子、脱塩素分解酵素遺伝子 *tceA*、*vcrA*、*bvcA* の q PCR および *Dehalococcoides* 16S rRNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンスに供試した。【結果および考察】メタン生成菌の生育阻害剤である BES を添加しなかった2条件では、*Dehalococcoides* 16S rRNA 遺伝子は実験開始時の 1.9×10^4 copies/mL から、 2.7×10^5 – 6.6×10^5 copies/mL まで増加し、*tceA* や *vcrA* も検出された。塩化鉄 (II) の添加により VC の完全分解速度は1.6倍大きくなり、また *tceA* や *vcrA* の増加も早く検出された。メタン生成菌共存下における二価鉄の共存が *Dehalococcoides* の増殖を促進し、クロロエチレン類の完全分解を促進したと推察される。一方、BES を添加した2条件では、*cis*-ジクロロエチレンや VC など分解が止まり、不完全分解となった。そのうち、塩化鉄 (II) および BES を添加した条件では、実験開始42日目で *Dehalococcoides* 16S rRNA 遺伝子は 8.0×10^5 copies/mL、*vcrA* は 5.3×10^5 copies/mL まで増加したものの、*tceA* は検出されなかった。本地下水におけるクロロエチレン類の完全分解には *tceA* を保持する *Dehalococcoides* の生息が不可欠であり、この細菌はメタン生成菌と強い共生関係にあることが示唆された。

P2-79

アナモックス細菌と共生する亜酸化窒素還元細菌の検出-15N トレーサ法の応用

○末永 俊和¹, 太田 琢², 堀 知行³, 利谷 翔平^{1,2}, 細見 正明², Kartik Chandran⁴, Sussane Lackner⁵, Barth F. Smets⁶, 寺田 昭彦^{1,2}

¹東京農工大院・GIR, ²東京農工大院・工, ³産総研, ⁴Dep. Earth Environ. Eng., Columbia Univ.,

⁵Dep. Civil Environ. Eng. Sci., Darmstadt Univ., ⁶Dep. Environ. Eng., Denmark Technical Univ.

嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) は省エネルギー型の排水処理システムとして着目されている一方で、亜硝酸に由来する高濃度の N_2O が蓄積することが報告されている。近年のメタゲノム解析により、Anammox 細菌と共生する細菌群に N_2O 還元能を持つものが含まれることが報告されているが、その生態や活性の有無は明らかになっていない。本研究は独立栄養な Anammox 汚泥における N_2O 還元活性の検出とその定量化を目的とした。15N トレーサ法を応用し、¹⁵N でラベリングした NO_2^- と ¹⁴N の NH_4^+ を添加してアナモックス活性を ¹⁵N¹⁴N(²⁹N₂) で検出した。また N_2O 還元細菌の活性検出のために ¹⁴N¹⁴N¹⁴N¹⁴N の N_2O を添加し、その消費速度と ¹⁵N¹⁵N(³⁰N₂) の生成速度の和から正味の N_2O 消費速度を算出した。また、16S rRNA アンプリコンシーケンスにより菌叢解析を、DNA, RNA レベルでの N_2O 還元機能遺伝子の存在をリアルタイム定量PCRにより検出した。200 mgN/L の NO_2^- と NH_4^+ をそれぞれ添加した人工無機培地で連続的に培養している Anammox リアクターの N_2O 存在量を調べたところ、中央値で溶存態として 0.963 mgN/L、ヘッドスペースには 528 ppm が恒常的に検出された。このバイオマスを用いて回分で ¹⁵N トレーサ法を行ったところ N_2O の生成は ¹⁵N¹⁵N¹⁴N が大部分を占め、 NO_2^- 由来の N_2O が生成していた。ここに添加した ¹⁴N¹⁴N¹⁴N¹⁴N は NO_2^- や NH_4^+ 存在下でも消費されており N_2O 還元活性の存在を定量的に確認した。本研究により、 N_2O 還元活性が Anammox 汚泥において確認された。このような極めて独立栄養的な環境にある状況下でも活性を発現できる N_2O 還元細菌は新たな N_2O 放出抑制技術に繋がるのが期待される。

P2-80

西日本における有毒渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の赤潮発生時に優占する 粒子付着性細菌

○菅野 菜々子¹, 山本 信二², 谷口 越則³, 湯口 真実⁴, 鈴川 健二⁵, 井口 大輝⁶, 山砥 稔文⁷, 吉村 直晃⁸, 朝倉 大河⁹,
菊地 淳⁹, 長井 敏¹

¹水研機構・中央水研, ²三重県南勢種苗セ, ³高知水試, ⁴愛知水試, ⁵愛媛水産研, ⁶大分水産研, ⁷長崎水試, ⁸熊本県水産課,
⁹理研環境資源

E-mail: kanno4n3a@affrc.go.jp

微細藻類の大発生による海洋の着色現象（赤潮）は周辺海域の環境状態を大きく変化させ、時に有毒藻類の増加や貧栄養化による漁業被害をもたらす。赤潮の発生、発達、消滅機構の生物学的要因のひとつとして、微細藻類の生育促進や阻害に関与する細菌が考えられている。しかし天然海洋環境での赤潮発生時にどのような細菌種が出現し影響を与えているのかは十分明らかにされていない。本研究では主に西日本で赤潮による漁業被害が報告される有毒渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の天然海洋での赤潮に関連する細菌種を探索するため、赤潮最盛期から消滅までの間の細菌組成解析を行った。

海水中の *K. mikimotoi* の形態形状による種同定と細胞数の計数は顕微鏡観察により行った。海水サンプルを 8 μm ポアサイズフィルターで集菌した画分を粒子付着画分とし、そのろ液を 0.22 μm ポアサイズフィルターで集菌した画分を浮遊画分として DNA 抽出を行った。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅し、MiSeq によって配列決定を行い、OTU は 99% 相同性で作成した。また愛知、愛媛、大分、長崎県沿岸での赤潮発生時の細菌組成も解析した。

三重県沿岸の付着画分より赤潮最盛期に優占する 2 つの OTU が検出され、それぞれ最大で 25% 以上の相対割合を占めた。2OTU の相対割合は *K. mikimotoi* 細胞数に正相関しており、*K. mikimotoi* 細胞表層に付着していたことが示唆される。2OTU は共に *Pseudomonas* 属に分類された。愛媛、愛知、長崎県からは *Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門に属する 7OTU の優占が見られたが、三重県で検出された OTU とは属レベルで異なった。大分県では特定の OTU の優占は見られなかったが、付着画分に特徴的な 2OTU が検出された。この 2OTU は *Proteobacteria* 門に分類されたが、他地域の OTU とは属レベルで異なった。

天然海洋環境下での *K. mikimotoi* 赤潮に関連する細菌株が属レベル以上で複数存在する可能性が示された。今回検出された細菌株と微細藻類との関係性や細菌株間での競争関係を解析することで、天然環境下での赤潮の発達および消滅への細菌の関与の一端が明らかになることが期待される。

PH-001

光触媒反応による放線菌二次代謝物の殺菌力向上

奥居 美音

東京工業大学附属科学技術高等学校

多くの抗生物質が放線菌二次代謝物である中、その殺菌力向上を目的に、放線菌培養時におけるTiO₂触媒による光触媒反応の付与が生成物に及ぼす影響について、定性的に検討した。土壌由来の4種類の放線菌を、きな粉(0.8%)、グルコース(1.2%)、TiO₂粉末(0.04%)添加の1.6%寒天培地に塗布し、30°C暗条件で培養した。培養から約4日後、ブラックライト(波長315~400 nm)を1日2時間、計4日間照射した。培養後、二次代謝物を濃度の異なる5つのメタノール(0~100 vol%)に分画回収した。各試料を含ませた円形ろ紙を、標準培地に塗布した枯草菌上に置き、30°Cで約24時間、抗菌活性試験を行った。結果から、1つの放線菌で得た2つの分画試料において、ブラックライト照射により阻止円径が増大した。すなわち、TiO₂による光触媒反応の付与により、抗菌活性の高い二次代謝物が合成されたものと考えられる。

PH-002

麹菌の成長に光が与える影響

吉村 涼矢

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

これまでの本校の研究により、麹菌はコロニーをつくる際、規則的に輪を形成することがわかった。本研究では体内時計と光との関係に注目し、麹菌に当てる光の条件を変えたときの菌糸の成長を比較することで、麹菌の輪の形成に光が与える影響を考察した。

麹菌を培養するのに特異な培地であるPDA培地を用いて麹菌を30度で5日間培養した。光を当てる周期は24時間周期とし、24時間遮光、24時間照射、1時間照射後23時間遮光の3つの条件で行った。麹菌は赤と青の光受容体をもっていることから、当てる光の色を白、赤、青の3種類で行った。培養後の輪と輪の幅、形成された分生子量を測定し、比較した。24時間遮光、24時間照射した場合には輪が形成されなかったことから、麹菌の場合は光の明暗の切り替えが輪をつくるスイッチになっていると考察した。

現在、1時間光をあてる時間帯を変えた場合と、1時間光をあてる回数を増やした場合とで比較実験を続けている。

PH-003

学校内で獲得したメタン細菌による食品廃棄物のエネルギー化の研究

山中 陽太, 多田 千夏, 今関 勇斗, 清野 碩, 成田 紗由美

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

現在、日本では約2700万tもの食料が焼却され、埋め立てられている。この食料廃棄物には糖などの高エネルギー化合物が多く含まれているが、運搬や焼却のために逆にエネルギーを使って処理している状況である。私達は食料廃棄物からエネルギーを取り出すことにより、資源が乏しい日本のエネルギー問題を解決できるのではないかと考え、高校の食堂から出る食料廃棄物を利用し、メタンやエタノールを生成して、活用することを目的として研究をしている。私達は研究の過程で自然に混入したメタン菌が、効率よくメタンを発生させていることに気が付いた。またこのメタン菌は常温よりも高温の方がよりメタンを発生させることを発見した。本発表では、私達が利用しているメタン菌の性質や、より効率よく働く条件について研究した結果を発表する。

PH-004

酵母に光を当ててみたら～カラフルな光と発酵～

村上 春菜

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

酵母が行う発酵という活動は古くから幅広く利用されており、酵母についてより詳しい事象が明らかになることで、酵母利用の効率化がはかれるのではないかと考え研究を始めた。本研究は酵母と同じ真菌である一部のカビが青色光で増殖が抑制されることに注目し、酵母にも同じ性質はあるのかを、様々な色の光を培養時に照射することによって発酵量、増殖量、死滅率はどうなるのか調べることを目的とした。

酵母を白・赤・青の光を照射し続けた場合と光をあてない場合で三日間嫌気培養した。嫌気培養後すべての培地を遮光条件下で一週間培養し、死滅率、増殖量、発酵量の三つの点について毎日計測した。その結果、培養時に青色光を照射すると発酵作用が抑制され、死滅率が増加し、赤色光照射下では発酵量が最大となった。現在、光自体が反応に影響を与えているのか、酵母の青色光受容体が光を吸収して影響を与えているのではないかと考え、光の透過量を比較している。

PH-005

麹菌の分泌物が菌糸の成長に与える影響

崩岡 万由希

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

和食はユネスコの無形文化財に指定されている。本研究では和食に欠かせない味噌や醤油、日本酒などの製造に用いられ日本の国菌である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) に着目した。麹菌は同一の培地上で培養した際、他のコロニーを認識し麹菌自身が分泌する化学物質により互いに菌糸の成長を抑制し合うことがわかっている。本研究では、麹菌が分泌する化学物質と菌糸の成長の関係を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。懸濁液を用いて麹菌を液体培地上に1点と2点それぞれ植菌し、5日間30度で静置培養した後、液体培地を回収した。回収した液体培地をろ過滅菌し、固体培地上の麹菌のそばに滴下した。その結果、1点植菌したものは気中菌糸を抑制したのに対し、2点植菌したものは気中菌糸と基底菌糸を抑制するという違いが見られた。この差は回収した液体培地中の物質の濃度によるものではないかと考え、現在2点植菌した培地を希釈したものを滴下し、検討している。

PH-006

木材腐朽菌を利用した雑草の効率的な肥料化

多田 千夏, 今関 勇斗, 山中 陽太, 成田 紗由美

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

刈り取った雑草などには、作物の生育に必要な栄養素が豊富に含まれている。しかしこのような有機物が分解されて再び植物が利用できるようになるには、長い時間が必要となる。焼き畑などで知られるように、「焼却」は有機物を肥料化するために有効な手段であるが、近年はダイオキシンの発生が問題視されているために、特に日本では用いることが出来ない状況である。

私達は木材を分解することが知られている木材腐朽菌を利用して、雑草からメタンガスなどのエネルギーを取り出す研究を行っている。この過程で私達は、環境条件を工夫すれば付着している木材腐朽菌を用いて、雑草を効率良く分解することが可能であることを発見した。分解の過程で、生育地での白い菌から黒い菌への推移より、この分解には複数種の木材腐朽菌が段階的に関わっていると考えられる。私達はこの発見を基に、温度や水分量、日照条件に着目して、最適条件の検討を行っている。

PH-007

細菌のアンピシリンに対する感受性の違い

佐藤 真菜

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

本校の研究により、アンピシリンに対する細菌の感受性は鶴見川において上流では弱く下流では強いことが分かっている。要因として上流と下流の環境の違い、特に周囲の施設の違いが挙げられているが、天候条件などの環境要因には触れられていない。そこで本研究では周囲の施設に加え、新たに天候と川の水質に着目し細菌のアンピシリンに対する感受性の違いを調べることが目的とした。雨天時は周囲の土や植物が晴天時より多く流れるため、下流の細菌の感受性が変化するのはないか。また、生息している細菌数や種類が水質によって変化し、それにともない細菌の感受性も変化するのはないかという仮説を立てた。天候による感受性の違いを比較するため、雨天時と晴天時に上流、下流から採取した水を植菌し、アンピシリン含有ディスクを置く。培養後、阻止円直径を測る。また、水質を比較するため、上流と下流でpH、COD、NO₂のパックテストをし、仮説を検証していく。

PH-008

カイコセリシンの抗菌作用

森井 瑛都

横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

本研究では、セリシンの保護作用に着目した。カイコからつくられる繭糸は主に2つのタンパク質から構成されている。繭糸全体の30%を構成しているセリシンは繭糸の外側にあり、カイコが安全に羽化できるよう保護している。本研究の目的は、セリシンが生物の生存にどのように関わるのかを調べることであり、本発表では大腸菌を扱った。

カイコに与える餌を人工飼料のみ、ソイプロテイン、ホエイプロテインを混ぜた飼料、に分け飼育し、繭糸をつくる器官である絹糸腺を取り出した。取り出した絹糸腺の懸濁液をシャーレの蓋にコートした。大腸菌を植菌し、シャーレの上から紫外線を15分あてた。大腸菌を1日培養後、エサの条件別に死滅率を調べた。結果、プロテインを与えたカイコの絹糸腺をコーティングすると死滅率が低くなり、ホエイプロテインを与えた方がより低くなった。現在、抽出したセリシンを塗布した培地で大腸菌を培養し、増殖の様子を比較している。

PH-009

大貫谷公園微生物群集発見捕獲大作戦 その3

梅村 隆人, 小河原 真人, 阿部 光彰, 杉本 響

学校法人国際学園 星槎高等学校

神奈川県横浜市の大貫谷公園には、200年以上前の手つかずの土壌が保存されている。ここに生息している顕微鏡サイズの微生物群集を対象にその動態に関して、仙台大会の高校生ポスター発表で、つまようじで土壌団粒を割り直接スライドグラスに分散して観察する微生物計数方法（つまようじ法）を発表し、沖縄大会の報告では異なる6地点において微生物群集の種類構成を比較したが、計数値に0が多く違いを明確にすることはできなかった。原点に戻って、計数法はこれで良いのか？ 計数値0をなくすもっと良い方法はないのだろうか？について検討したが、方法がより複雑になるためつまようじ法を用いることとした。種類構成は上部の植生の影響を受けている様子が見られたので、今回は手つかずに保存されている地下20cmの微生物群集の種類構成に関して報告する。表層との比較が十分に行われていないが、現段階では有殻アメーバが土壌の微生物群集の中心にあると考えられ、生きている有殻アメーバを検出する方法を検討中である。

PH-010

トウキョウサンショウオを守るために ～アメリカザリガニの生態調査及び防除 2019～

檜山 凌太, 木内 康太郎, 加藤 大起, 本間 満, 川村 颯, 千葉 悠喜, 梁島 遥輝, 福澤 崇吾
栃木県立宇都宮北高等学校 科学研究部

栃木県宇都宮市の戸祭山緑地に棲息しているトウキョウサンショウオ（人里に暮らしており山奥にはいない）は、2008年10月に宇都宮市の天然記念物に指定され守るべきであり、宅地造成がすすむこの地区で、産卵地と林も残すことになった。しかし、ザリガニが捕食していることが知られている。本研究の目的は、ザリガニの個体数を推定し、サンショウオの個体数減少との関係を考察するためである。一度捕ったザリガニが分かるようにマーキングをして放し、その後ボランティア団体などの駆除活動で再び捕まった数をかぞえた。調査期間：2018年6月9日～10月28日。本校による再捕獲日：12回。ボランティア団体などによる再捕獲日：15回。マーキングは、すべて本校生が行った。マーキングし放した個体は、90個体。マーキングして再び捕獲された個体が3個体。少ないデータの中ではあるが、现阶段では、駆除しているザリガニは、東池に棲息しているザリガニの3.3%といえる。他の地点に比べて、東池でトウキョウサンショウオの卵嚢数が極めて少ないことと、駆除率の低さが関連していると考えられる。トウキョウサンショウオの保全には、ザリガニの捕獲防除が必要と考えられる。

PH-011

プロポリスの摂取によるマウス腸内フローラの変化

工藤 隼己

山村学園 山村国際高等学校 生物部

生物部では、微生物をマーカーとして、近年、健康食品として注目されているマヌカハニーの抗菌効果やモデルマウスから病気の予防や治療の研究を行っている。今回の研究は、長年にわたり民間療法の健康食品として飲み続けられているプロポリスの人気の秘密に迫るために実験を実施した。

プロポリスは、ハチミツの様に日本でも広く飼育されているセイヨウミツバチの巣由来の成分であり、健康食品として人気が高いことから、これをマウスに経口投与し腸内細菌フローラの変化を解析した。プロポリスの投与によりマウス腸内細菌フローラは、善玉菌として知られている乳酸桿菌が3～5倍に増加し、日和見菌のプロポテラは平均24.1分の1（日本製は42.5分の1；イタリア製は13.4分の1；ブラジル製は16.4分の1）に減少した。

以上の結果から、一定期間のプロポリス摂取は、腸内の善玉菌を増やし、日和見菌を減らすなど、腸内細菌フローラのバランス改善に作用する可能性が強く示唆された。

PH-012

加工抗菌食材の食中毒原因菌におよぼす抗菌効果

田中 さくら

山村学園 山村国際高等学校 生物部

生物部では、微生物を対象に健康食品の抗菌や、モデルマウスから病気の予防や治療の研究を行っている。1年生部員の私は抗菌に興味があったので、家庭にあるチューブ入りの加工抗菌食材でも食中毒原因菌に抗菌効果があると考え（仮説）研究に取り組んだ。

加工抗菌食材としては、「本わさび」・「本からし」・「生にんにく」の3種類を使用した。抗菌効果の測定はペーパーディスク法とし、マーカーの食中毒原因菌は黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの2株を使用した。

黄色ブドウ球菌や腸炎ビブリオへの抗菌効果は、「本わさび」と「本からし」では阻止円範囲も広く、高い抗菌効果が観察された。この効果は、「本わさび」と「本からし」に含有される揮発性の辛味成分によるものと考察した。一方「生にんにく」では、阻止円範囲も狭く抗菌効果が低下した。これは、「生にんにく」では臭気成分が強く、揮発性の辛味成分は低下したものと考察した。

PH-013

女子必見！マウス腸内細菌フローラから痩せる乳酸菌チョコレート発見！

稲田 未来

山村学園 山村国際高等学校 生物部

先輩による潰瘍性大腸炎モデルマウスの研究は、機能的食品による腸内細菌フローラの変化から、この疾患の治療を検証した。しかし私は1年生、しかも女子部員。そこで、女子に関心のあるダイエットに注目して、乳酸菌チョコレートを摂取すれば腸内環境を改善してダイエットにつながると考え（仮説）研究を実施した。

マウスに「おやつ」として、乳酸菌が添加された乳酸菌チョコレートと普通のチョコレートを、10代後半から20代の若い女性の平均体重に換算してメーカー奨励量を摂取させた。

マウスの腸内細菌フローラの観察から、乳酸菌チョコレートを摂取すると乳酸菌やビフィズス菌が増加した。また、痩せ菌を含むバクテロイデスの増加も観察され、マウスの体重も5%ほど減少した。

乳酸菌チョコレートの摂取により腸内細菌フローラが改善され、特に痩せ菌を含むバクテロイデスの増加からか、体重も減少すると考察した。女子必見！のダイエットにつながる発見となった。

PH-014

ヤーコンによる2型糖尿病モデルマウスのインスリン抵抗性の改善効果

今井 柚貴

山村学園 山村国際高等学校 生物部

これまでの研究は、マウスに「高脂質飼料」を与え2型糖尿病モデルを完成させ、これにグルコースやインスリンを投与し、2型糖尿病の病理形態の理解を図ってきた。本研究では、このモデルから2型糖尿病の予防を考えた。予防にはフラクトオリゴ糖を豊富に含むヤーコンを与え、インスリン抵抗性の改善効果（仮説）を研究した。

「普通飼料」・「高脂質飼料」・「ヤーコンと高脂質飼料」の3区に分け、体重増加や空腹血糖値、また腸内細菌フローラの観察と短鎖脂肪酸の産生量から改善効果を検討した。

「ヤーコンと高脂質飼料」区は、空腹血糖値や体重の増加が改善され、また腸内細菌フローラのバクテロイデスも増加し、短鎖脂肪酸の産生量も増えた。

2型糖尿病モデルマウスに「ヤーコン」を投与すれば、腸内細菌フローラのバクテロイデスの増加からか、短鎖脂肪酸が産生され腸管内での脂肪の取り込みや蓄積を抑える等、インスリン抵抗性の改善効果が得られた。

PH-015

身近な食材には薬剤耐性を持つ細菌が存在する

Antibiotic-resistant bacteria are present in familiar foods

山下 明孝, 棗 一世, 市川 潤

山梨県立上野原高等学校 科学部

加熱調理には殺菌作用があるが、高温で死滅しない耐熱性細菌の存在とそれが原因で起こる食中毒の問題を知った。そこで食材を滅菌PBSで拭き取り、煮沸し、ウェルシュ菌選択培地に塗布した。好気条件および嫌気条件下で48時間培養し、コロニーの性状を観察した。

煮沸した場合コロニーは検出できなかったが、煮沸しない鶏肉サンプルから、好気条件下で必ず黄色ブドウ球菌様のコロニーが検出された。選択培地はカナマイシン含有なので、耐性菌の可能性を疑った。コロニーからDNAを抽出し、カナマイシン耐性遺伝子を標的とするPCRを試みた結果、耐性の原因となるaadD遺伝子を持つことがわかった。さらにブドウ球菌選択培地から多数のコロニーが検出された。耐熱性細菌は検出できなかったが、薬剤耐性のブドウ球菌が鶏肉には高頻度で付着していると思われる。その原因は、鶏の飼育方法や加工過程にあると推測する。

PH-016

ミドリゾウリムシのナゾに迫る！

天野 隼, 市原 慶悟, 佐橋 浩太郎
岐阜県立加茂高等学校 自然科学部

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) はクロレラが細胞内に共生していて光合成を行っている。私たちは、ミドリゾウリムシの再共生の過程から共生のメカニズムを解明すること、共生後の変化を明らかにすることを目的としている。ミドリゾウリムシはレタスと枯草菌を混ぜた液体を使うことで培養し、これを暗条件で飼育することで白化した個体を作成することができた。再共生に必要なクロレラはミドリゾウリムシをホモジナイザーで細胞をしたり、超音波処理と冷凍の後解凍したりすることで取り出した。再共生は、上記の実験でできた2つを混ぜることで、確認することはできたが、培養して、形質が遺伝するのか、子孫は残せるのかの確認まではできていない。白化したミドリゾウリムシは、光合成という手段を失ったためか、ゾウリムシよりも繁殖しにくかった。ミドリゾウリムシに進化したことで、クロレラに依存するようになってしまったのではないかと考える。

PH-017

オカダンゴムシのフンから単離した *Brevibacterium* 属放線菌による抗カビ物質生産

片岡 柁人
島根県立出雲高等学校 自然科学部

私の過去の研究で、オカダンゴムシのフンに、カビである *Penicillium steckii* を抑制する効果があることがわかった。本研究では、フンの中の細菌が、そのカビを抑制するか調査した。まず、3種類の寒天培地にフンを塗布して計39株の細菌・放線菌・カビを単離し、カビ (*P. steckii*) を抑制した面積が最も広い一株を選抜した。この株をH4株と呼ぶ。H4株は、形態観察、16S rRNA 遺伝子による系統樹解析、生化学性状解析から、*Brevibacterium* 属の放線菌で、*B. sediminis* と最も近縁であった。次に、H4株が生産する抗カビ物質の性質を調べた。H4株とカビの間で寒天培地を分断した状況下で、発芽前と成長後のそれぞれの段階のカビへの抑制効果を検証し、その後H4株を除去し以後の経過観察を行った。結果、H4株は、カビの発芽前と成長後の両方に抑制効果を示し、除去後にカビの形質異常を引き起こす揮発性の抗カビ物質を生産していることがわかった。

PH-018

全国の酢屋で受け継がれてきた酢酸菌の遺伝子の比較と特徴

田中 千遥
愛媛大学附属高等学校 理科部

人類最古の調味料のお酢は、酢酸菌によって作られる。伝統的な製法でお酢を作る企業は、自社の酢酸菌を代々植え継いでいる。また、企業の創業時や災害復興時には、酢酸菌を含む種酢を同業他社から譲り受けていると知った。そこで本研究では、企業が植え継ぐ酢酸菌の遺伝子解析によって、種酢の授受の記録を分子系統解析で証明できるのか、地理的距離が近ければ遺伝的距離も近いのかを調べた。伝統的な製法でお酢を作る全国23の企業から種酢サンプルを集めて細菌を単離し、16S rRNA 遺伝子に基づいて同定した結果、32株の酢酸菌を得た。その中で17株と最も多くの株が得られた酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* のアルコール脱水素酵素遺伝子領域の塩基配列を解析した。系統解析した結果、過去に種酢の授受を行った企業間、距離が近い企業間ともに系統関係は近くなく、企業が使用している原料の種類によって系統が分かれた。現在は、他領域の解析、野外株の解析も進めている。

PH-019

耐塩性・好塩性細菌の塩分濃度を下げるメカニズムの解明

山田 宗草

愛媛県立今治西高等学校 生物部

私は好塩性細菌の土壌中の塩分濃度を下げるメカニズムの解明を目指し研究を行っている。最終的には、好塩性細菌を用いた塩害土壌の改善を行っていく。まず、19種類の天日塩からマリンプロス寒天培地（以下MB培地）と標準寒天培地を用いて菌体を単離した。その結果、MB培地では15種類、標準寒天培地では3種類の天日塩から好塩性細菌と考えられる菌体を単離した。これはMB培地の方がイオン組成が豊富で、菌体にとって浸透圧調節がしやすかったためだと考えられる。単離菌株の好塩性を検証するために前述のMB培地の10倍希釈のMB培地を3%と15%に設定して培養を行った。その結果、天日塩H株でのみ、3%と15%の両方で増殖を確認でき、ほかの株は3%でのみ増殖を確認できた。今後は天日塩H株を用いて高塩分濃度下での細胞膜の作用や、菌体内蓄積物質に着目して好塩性細菌の土壌中の塩分濃度を下げるメカニズムを解明していく。
