

# 日本微生物生態学会 第 31 回大会

## JSME 2016

### 講演要旨集

会期 平成 28 年 10 月 23 日（日）～25 日（火）  
会場 横須賀市文化会館（横須賀市深田台 50）

初版：2016 年 10 月 7 日  
改訂2版：2016 年 10 月 19 日

# 目次

協力機関・協賛企業一覧	3
会長 ご挨拶	4
大会組織名簿	5
大会日程表	6
大会会場アクセス	12
大会会場案内図	13
<b>プログラム</b>	<b>14</b>
受賞講演・招待講演	15
総会・パネルディスカッション	16
シンポジウム	17
一般ポスター発表	20
シンポジウム出張ポスター発表	34
高校生ポスター発表	35
<b>講演要旨</b>	<b>36</b>
受賞講演	37
招待講演	40
パネルディスカッション	43
シンポジウム	44
若手交流会・研究部会	75
一般ポスター発表	77
シンポジウム出張ポスター発表	327
高校生ポスター発表	329
ランチョンセミナー	343
発表者索引	344
賛助企業の紹介	352
広告	353

## 協力機関一覧

後援：横須賀市

共催：日本細菌学会

共催：日本原生動物学会

共催：日本地球化学会

## 協賛企業一覧

### Gold スポンサー

サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)

(株)ファスマック

### Silver スポンサー

アルテア技研(株)

SI サイエンス(株)

J-POWER (電源開発(株))

(株)センシュエ科学

日油技研工業(株)

(株)丸菱バイオエンジニア

エーエムアール(株)

ジャスコインタナショナル(株)

(株)生物技研

ChunLab, Inc.

(株)マクロジェン・ジャパン

### Bronze スポンサー

天野エンザイム(株)

いであ (株)

新江ノ島水族館 (江の島ピーエフアイ(株))

竹田理化工業(株)

(株)東方技研

(株)ニッポンジーン

日本ジェネティクス(株)

理科研(株)

(株)池田理化

(株)環境総合テクノス

ZERO

(株)テクノスルガ・ラボ

日産自動車(株)

日本エヌ・ユー・エス(株)

パナソニック ヘルスケア(株)

(株)メイズ

## 会長 ご挨拶



失敗からも糧を得る！

日本微生物生態学会会長 南澤 究

海洋研究開発機構(JAMSTEC)の会員は学術的に大きな貢献されてきましたが、微生物生態学会の大会が JAMSTEC で開催されるは 1985 年の学会創立以来初めてです。横須賀大会では、サイエンスの面白さをアピールする企画や、ポスター賞受賞者による講演、学会そのもの論を議論する企画など、今までにない工夫がありますので、歴史的な大会になると大いに期待しております。

微生物生態学は、地圏、水圏、大気圏にまたがる地球スケールでの微生物の多様性と物質循環、生命の発生と進化、生物間相互作用、微生物機能テクノロジー、食料生産など、広範な分野をまたがる学際領域です。私が強調したいことは、微生物の狩人である私たちの研究が生命科学・地球科学・環境科学に大きなインパクトを与え、それが逆に微生物生態学にフィードバックする研究の流れが今始まっています。モデル生物の生命科学・微生物抜き地球科学や環境科学に微生物生態研究がリンクすることで新しい世界が見えています。

微生物生態学会には若手も含めてフラットで自由闊達な雰囲気があります。このような皆さんの活力をもって、この間、種々のネットワークを張る努力をしてきました。一つは、環境微生物系学会合同大会（浜松、来年は仙台）や医学系微生物学会との共催シンポの開催を通じて、日本の微生物系学会を統合する流れを作りつつありますし、生命科学領域においても分子生物学会と生物化学会が提案する合同大会にも積極的参画しています。地球惑星連合とアジア微生物生態シンポも少しずつ前進しています。

昨今の科学研究を取り巻く厳しい環境ですが、その時代にあった学会の姿は必ずあります。世界の研究動向・会員と社会の期待に耳を傾け、常に学会や学会誌あり方を議論することにより、微生物生態学会は会員や学生に魅力的な学会であり続けたいところです。また、楽しく研究と交流を行い、オープンマインドの姿勢で他学会や社会に発信していけば、微生物生態研究の輪が必ず広がるものと確信しています。斬新な企画がある横須賀大会ですが、実験と同じで、失敗からも糧を得ることができます。各企画について肯定的および否定的意見を遠慮なく学会に是非お寄せください。会員の方々のシビアな評価が学会を元気にしていきますので。



## 大会組織名簿

### 大会実行委員会

大会委員長： 山本 啓之（海洋研究開発機構）  
総合プロデューサー： 高井 研（海洋研究開発機構）  
委員： 布浦 拓郎（海洋研究開発機構）  
平山 仙子（海洋研究開発機構）  
井町 寛之（海洋研究開発機構）  
山本 正浩（海洋研究開発機構）  
宮崎 征行（海洋研究開発機構）  
島村 繁（海洋研究開発機構）

大会事務局連絡先： 電子メール [jsme2016@jamstec.go.jp](mailto:jsme2016@jamstec.go.jp)

業務委託： 株式会社エー・イー企画

大会 HP： <http://www.microbial-ecology.jp/meeting/JSME2016/index.html>

## 大会日程表

### 10月22日（土）

時間	第1会場（大ホール）	第2会場（展示室）
13:00-17:30	市民講演会&サイエンスエンターテイメント	-
18:00-19:00	第31回大会 若手交流会	-

※ 第1会議室にて M&E 編集幹事会 (9:15-11:00)、M&E 編集委員会 (11:00-13:00)、評議委員会 (17:30-20:00)を開催

### 10月23日（日）

時間	第1会場（大ホール）	第2会場（展示室）
09:20-09:25	開会式	-
09:25-10:25	招待講演 1 Rudolf Kurt Thauer 氏 “Flavin-based electron bifurcation, a novel mechanism of energy coupling in anaerobic microorganisms”	-
10:25-11:30	奨励賞授賞式、受賞講演	-
11:30-12:05	論文賞授賞式、受賞講演	-
12:10-13:00 (昼休憩)	-	教育研究部会 「昨年度の活動報告 および今年度の活動計画について」
13:10-16:10	ポスター発表(一般/高校生)（会場：ホワイエ・市民ギャラリー）	
16:10-17:10	男女共同参画・ダイバーシティ推進委員会 教育講演 岡部 正隆 氏 「色覚の多様性とカラーユニバーサルデザインCUD」	-
17:10-18:25	総会	-
18:25-19:40	大会事務局プレゼンツ 緊急パネルディスカッション 「学会って必要か？微生物生態学会ってホントにいるけ？」	-

## 10月24日(月)

時間	第1会場(大ホール)	第2会場(展示室)
09:15-11:25	S1: 地球化学会プレゼンツシンポジウム 「"微生物はそえるだけ" (桜木花道)」	S2: シンポジウム Microbial evolution to a changing environment
11:40-12:30 (昼休憩)	-	微生物電気化学研究部会 「微生物電気化学研究部会 セミナー2016」
12:40-14:50	S3: シンポジウム 「群集生態学の最新アプローチであぶり だす微生物間ネットワークの真実」 Elucidation of extremely complex microbial networks via updated synecological technologies	S4: シンポジウム 「ウイルスの存在意義を 論じてみませんか?」 Would you like to discuss the raison d'être for viruses?
14:50-17:50	ポスター発表(一般) (会場: ホワイエ・市民ギャラリー)	
18:30-20:30	懇親会 (会場: セントラルホテル)	

## 10月25日(火)

時間	第1会場(大ホール)	第2会場(展示室)
09:15-10:00	招待講演2 福田 真嗣 氏 「茶色い宝石から紐解く 腸内微生物生態系の真実」	-
10:10-12:20	S5: 日本細菌学会共催シンポジウム 「寄生と病原性から紐解く 微生物進化のパラダイム」 Parasitism and pathogenesis: paradigms in microbe evolution	S6: 日本原生生物学会共催シンポジウム 「原生生物の環境センシングと運動」 Protist Motility : sensing and responding to environmental signals
12:30-13:20 (昼休憩)	-	ランチョンセミナー サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)
13:30-14:30	ポスター賞受賞講演 最優秀発表表彰	-
14:30-15:00	閉会式	-

一般・高校生ポスター発表

	ホワイエ	市民ギャラリー1	市民ギャラリー2
	掲示ポスター： P-001 ～ P-074	掲示ポスター： P-075 ～ P-193	掲示ポスター： P-194 ～ P-249 H-01 ～ H-20 P-S2 ～ P-S6
10/23 (日) 9:00～	ポスター掲示可能		
10/23 (日) 13:10-16:10	一般ポスター [1分間ライトニングトーク： 13:10～14:10頃@街角討論会場] [コアタイム：一般会員 14:40～15:10、学生会員 15:10～16:10]		高校生研究発表 セッション [優秀賞表彰]
10/24 (月) 14:50-17:50	一般ポスター [コアタイム：奇数番号 14:50～16:20、偶数番号 16:20～17:50]		シンポジウム 出張ポスター
10/24 (月) 18:00-21:00	ポスター賞発表 (会場: セントラルホテル)		
10/25 (火) 12:30-13:30	ポスター回収 (回収時間を過ぎても掲示されているポスターは、事務局で撤去の上、 会期終了後に廃棄いたしますのであらかじめご了承ください。)		
10/25 (火) 13:30-14:30	ポスター賞受賞講演、最優秀発表賞表彰 [第1会場 (大ホール) にて開催]		

1 分間ライトニングトーク (10/23 (日) 13:10~14:10 頃@街角討論会場)

会場	街角議論 1 ホワイエ 2F	街角議論 2 ホワイエ 1F	街角議論 3 市民ギャラリー	街角議論 4 市民ギャラリー	街角議論 5 市民ギャラリー
発表 ポスター番号 Poster Number	P-001 ~ P-037 (37 演題)	P-038 ~ P-075 (38 演題)	P-076 ~ P-125 (50 演題)	P-126 ~ P-183 (58 演題)	P-184 ~ P-249 (66 演題)
該当 セッション (Session)	環境工学、 微生物間相互作用 "Environmental engineering", "Interaction between microorganisms"	生理 / 代謝 / 増殖 / 分類、 方法論・情報・ゲノム解析、 方法論・観察と単離 "Growth, metabolism, physiology and phylogeny of microorganisms", "Methods for informatics and genomics of environmental microbiology", "Methods for observation and cultivation of environmental microbiology"	土壌生態系、 海洋表層生態系、 陸水の生態系、 熱水・地熱環境の生態、 アストロバイオロジー / 生 命の起源 / 大気圏 "Soil and terrestrial microbial ecology", "Ocean microbial ecology", "Freshwater microbial ecology", "Microbial ecology in thermal environments", "Astrobiology/origin of life/atmospheric habitats"	土壌の物質循環、 水圏の物質循環、 地下環境の物質循環、 金属・ヒ素と物質循環、 電気と微生物、 光と微生物 "Material cycle in soil environments", "Material cycle in aquatic environments", "Material cycle in subsurface environments", "Metal and metalloid with material cycle", "Microbiology with electricity", "Microbiology with light"	共生・理論、 無脊椎動物-微生物相互作 用、 脊椎動物-微生物相互作用、 植物-微生物相互作用、 水圏植物-微生物相互作用、 ウイルス / モバイルエレメ ント "Symbiosis and ecological theory", "Microbial Interaction with invertebrate", "Microbial Interaction with vertebrate", "Microbial Interaction with plant", "Microbial Interaction with aquatic plant", "Virus and mobile elements"

## 会場別スケジュール表

日	時	第1会場 (大ホール)	第2会場 (展示室)	ポスター会場 (市民ギャラリー &ホワイエ)	企業展示会場 ドリンクコーナー (中ホール)	談話室 (第1会議室)	
22 土	9					M&E 編集幹事会 9:15 - 11:00	
	10						
	11						
	12					M&E 編集委員会 11:00 - 13:00	
	13	市民講演会 & サイエンスエンターテイメント (入場無料) 13:00 - 17:30					
	14						
	15						
	16						
	17						
	18	若手交流会 18:00 - 19:00					評議委員会 17:30 - 20:00
19							
23 日	9	開会式・招待講演 Prof. Dr. Rudolf Thauer 9:20 - 10:25				談話室解放 9:30 - 19:40	
	10	奨励賞・論文賞 授賞式・受賞講演 10:25 - 12:05					
	11						
	12		教育部会 12:10-13:00		企業展示 12:00 - 18:00		
	13			1分間ライトニングトーク 13:10 - 14:10頃			
	14			ポスター発表 13:10 - 16:10			
	15						
	16	男女共同参画・ダイバーシティ推進委員会 教育講座 16:10 - 17:10					
	17	学会総会 17:10 - 18:25					
	18	緊急パネルディスカッション 18:25 - 19:40					
19							

日	時	第1会場 (大ホール)	第2会場 (展示室)	ポスター会場 (市民ギャラリー &ホワイエ)	企業展示会場 ドリンクコーナー (中ホール)	談話室 (第1会議室)
24 月	9	S1 シンポジウム 地球化学会プレゼンツ	S2 シンポジウム 「Microbial evolution to a changing environment」		企業展示 9:30 - 17:30	談話室解放 9:30 - 19:15
	10	「微生物はそえるだけ」(桜木花道)」 9:15 - 11:25	9:15 - 11:25			
	11		微生物電気化学研究部会セミナー 11:40 - 12:30			
	12	S3 シンポジウム	S4 シンポジウム			
	13	「群集生態学の最新アプローチで あぶりだす微生物間ネットワークの真	「ウイルスの存在意義を 論じてみませんか？」			
	14	12:40 - 14:50	12:40 - 14:50			
	15			ポスター発表 14:50 - 17:50		
	16					
	17					
18	懇親会 18:30- (於 セントラルホテル)					
25 火	9	招待講演: 福田 真嗣 氏 9:15 - 10:00			企業展示 9:30 - 12:30	談話室解放 9:15 - 14:30
	10	S5 シンポジウム 日本細菌学会共催	S6 シンポジウム 日本原生生物学会共催			
	11	「寄生と病原性から紐解く 微生物進化のパラダイム」	「原生生物の環境センシングと運動」			
	12	10:10 - 12:20	10:10 - 12:20			
	13		ランチョンセミナー 12:30 - 13:20 Thermo Fisher Scientific 社			
	14	ポスター受賞講演・閉会式 13:30 - 15:00				

# 大会会場アクセス

## 会場

### 横須賀市文化会館

〒238-0016 横須賀市深田台 50 番地

Tel: 046-823-2950

Fax: 046-823-6547

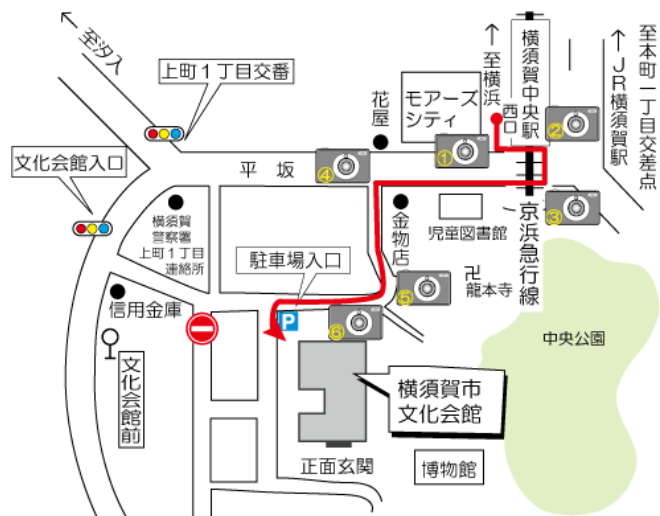
HP: [http://www.yokosuka-bunka.info/culture/bunka\\_about.html](http://www.yokosuka-bunka.info/culture/bunka_about.html)

## アクセス

大会会場に「有料駐車場」はありますが、できる限り公共交通機関を利用下さい。

### 最寄り駅からのアクセス

- ・京浜急行 横須賀中央駅から  
京浜急行「横須賀中央駅」下車  
西口改札を出て徒歩 10 分



- ・ J R 横須賀駅から  
J R 横須賀線「横須賀駅」下車  
京浜急行バス乗車約 10 分 (乗車時間は目安)  
バス停「文化会館前下車」 徒歩 3 分

右記バス乗り場よりご乗車下さい。

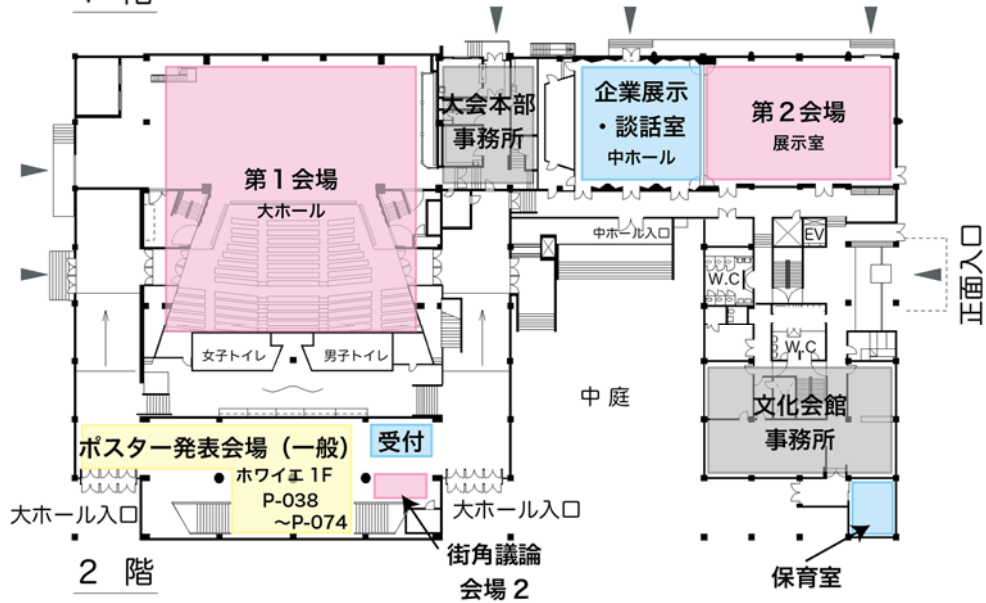
\*土・日は周辺道路が混みあう為、  
ご注意下さい。

のりば 番号	系統	行先
①	須 1	「衣笠駅(衣笠十字路)」行
②	須 3	「横須賀市民病院」行
②	須 4	「大楠芦名口」行
②	須 5	「長井」行
②	須 8	「三崎口駅」行
②	須 11	「YRPセンター」行

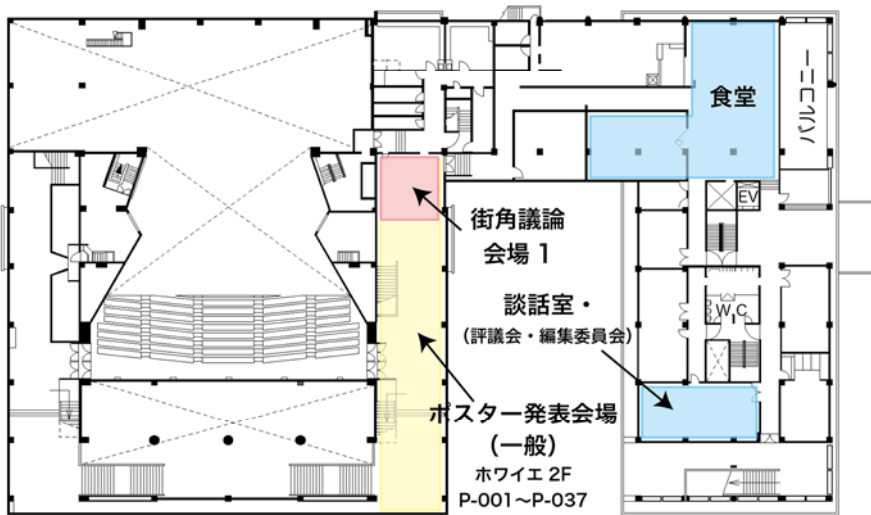


# 会場案内図

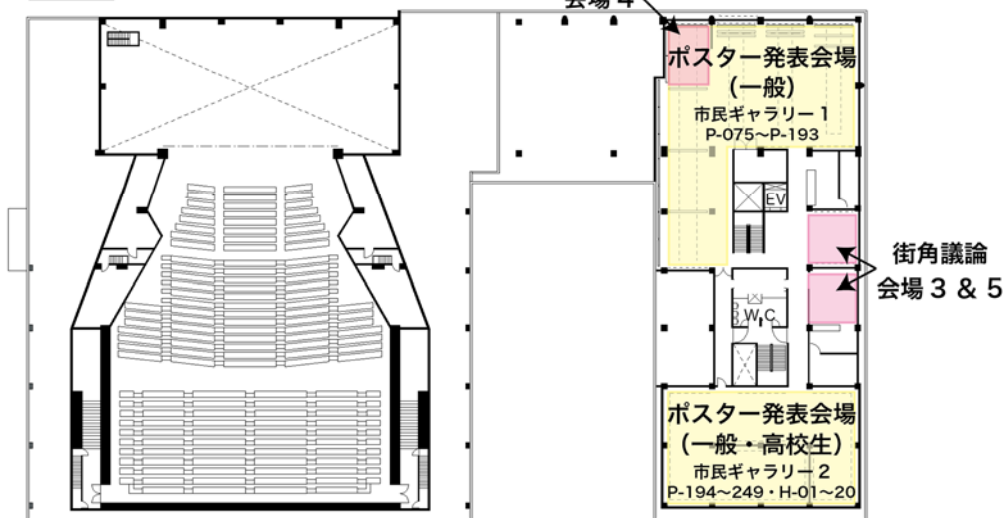
## 1 階



## 2 階



## 3 階



# プログラム

## 受賞講演・招待講演

会場：第1会場（大ホール）

招待講演 1            10月23日（日）09:25-10:25

Rudolf Kurt Thauer 博士（Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology 名誉教授）

‘Flavin-based electron bifurcation,

a novel mechanism of energy coupling in anaerobic microorganisms’

受賞式・受賞講演    10月23日（日）10:25-12:05

### 奨励賞

カメムシ類の腸内共生細菌に関する研究

～垂直伝播を伴わない昆虫内部共生系の発見、そしてその発展～

○菊池 義智（産総研・生物プロセス）

医科微生物生態学の創成に関する研究 – そして次に何をを目指すのか –

○丸山 史人（京都大・医）

### 論文賞

オオホシカメムシが解き明かすカメムシ類–*Burkholderia* 共生系の進化

Bordered plant bugs are a key taxon for elucidating the evolution of stinkbugs

–*Burkholderia symbiosis*

○竹下 和貴（北海道大学／産総研・生物プロセス）

男女共同参画・ダイバーシティ推進委員会 教育講演    10月23日(日)    16:10～17:10

岡部 正隆 博士（東京慈恵会医科大学解剖学講座 教授）

NPO 法人カラーユニバーサルデザイン機構 副理事長）

「色覚の多様性とカラーユニバーサルデザイン CUD」

招待講演 2            10月25日（火）09:15-10:00

福田 真嗣 博士（株式会社メタジェン CEO／慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授）

「茶色い宝石から紐解く腸内微生物生態系の真実」

ポスター賞受賞講演 10月25日(火) 13:30-14:30

ポスター賞受賞者による受賞講演会 (1演題 10分内)

この講演により、最優秀発表賞1件を選出し表彰します。

## 総会

日時：10月23日 17:10~18:25

会場：第1会場 (大ホール)

## パネルディスカッション

会場：第1会場 (大ホール)

大会事務局プレゼンツ 緊急パネルディスカッション 10月23日(日) 18:25~19:40

「学会って必要か？微生物生態学会ってホントにいるけ？」

司会：横須賀大会総合プロデューサー 高井 研

パネリスト：学会バスターズの皆さん、学会保守派の皆さん

## シンポジウム

10月24日(月) 09:15~11:25

第1会場 (大ホール) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第2会場と入れ替えられる可能性があります。

### S1 地球化学会プレゼンツシンポジウム

「微生物はそえるだけ」(桜木花道)」

オーガナイザー：川口 慎介 (海洋研究開発機構)、高井 研 (海洋研究開発機構)

- 09:15 S1-1 ホモ・サピエンスが創りだした新しい世界と環境  
○川幡 穂高 (東京大学大気海洋研究所)
- 09:45 S1-2 電気化学でもたらす生命の起源  
○北台 紀夫 (東京工業大学地球生命研究所)
- 10:25 S1-3 ヒ素と水銀の地球化学的研究史を編む  
○板井 啓明 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
- 10:55 S1-4 木を見ず森を知る：微生物を斟酌せずに硝化速度や脱窒速度を測る  
○角皆 潤 (名古屋大学大学院環境学研究科)

第2会場 (展示室) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第1会場と入れ替えられる可能性があります。

### S2 Microbial evolution to a changing environment

オーガナイザー：石井 聡 (ミネソタ大学、USA)、丸山 史人 (京都大学)

- 09:15 S2-1 Plant-growth promoting bacteria from extreme environments  
○Milko Jorquera (ラフロンテラ大学、Chili)
- 09:45 S2-2 Soil microbial response to environmental stresses - does being indigenous help?  
○Michael Sadowsky (ミネソタ大学、USA)
- 10:25 S2-3 Microalgal blooms in a changing ocean  
○Paulo Solomon (リオデジャネイロ連邦大学、Brazil)
- 10:55 S2-4 パネルディスカッション

10月24日(月) 12:40~14:50

第1会場 (大ホール) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第2会場と入れ替えられる可能性があります。

**S3 群集生態学の最新アプローチであぶり出す微生物間ネットワークの真実**

**Elucidation of extremely complex microbial networks**

**via updated synecological technologies**

**オーガナイザー：中川 聡 (京都大学)、加藤 広海 (東北大学)**

- |       |      |  |
|-------|------|--|
| 12:40 | S3-1 | 群集生態学であぶり出す共生微生物間の大規模ネットワーク<br>○東樹 宏和 (京都大学)   |
| 13:10 | S3-2 | 再構築された土壌微生物群集の超長期培養<br>○加藤 広海 (東北大学)           |
| 13:50 | S3-3 | 群集の理解における進化の役割<br>○山道 真人 (京都大学)                |
| 14:20 | S3-4 | 時系列データを用いた因果ネットワーク推定法の最前線<br>○阿部 真人 (国立情報学研究所) |

第2会場 (展示室) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第1会場と入れ替えられる可能性があります。

**S4 ウイルスの存在意義を論じてみませんか？**

**Would you like to discuss the raison d'être for viruses?**

**オーガナイザー：長崎 慶三 (高知大学)、緒方 博之 (京都大学)**

- |       |      |  |
|-------|------|--|
| 12:40 | S4-1 | 水圏ウイルスハンティング今昔：細胞死が狩りの合図だった時代<br>○長崎 慶三 (高知大学) |
| 13:00 | S4-2 | アメーバウイルス研究がもたらしたインパクト<br>○緒方 博之 (京都大学)         |
| 13:20 | S4-3 | 宿主を殺さず共存するウイルスを網羅する時代へ<br>○浦山 俊一 (海洋研究開発機構)    |
| 13:50 | S4-4 | ウイルスと微生物の競合的共進化<br>○吉田 天士 (京都大学)               |
| 14:10 | S4-5 | ウイルスによるロドプシン遺伝子の水平伝播<br>○吉澤 晋 (東京大学)           |

10月25日(火) 10:10~12:20

第1会場 (大ホール) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第2会場と入れ替えられる可能性があります。

**S5 日本細菌学会共催シンポジウム**

**寄生と病原性から紐解く微生物進化のパラダイム**

**Parasitism and pathogenesis: paradigms in microbe evolution**

**オーガナイザー：菊池 義智 (産業技術総合研究所)、山口 博之 (北海道大学)**

- |       |      |   |                          |
|-------|------|---|--------------------------|
| 10:10 | S5-1 | 全ゲノム解析から見えてくるマダニ媒介性タイレリア原虫の動物血球細胞への卓越した寄生様式 | ○林田 京子 (北海道大学)           |
| 10:40 | S5-2 | アメーバに感染する巨大 DNA ウイルスから生命進化を読み解く             | ○武村 政春 (東京理科大学)          |
| 11:20 | S5-3 | レジオネラの分泌装置とエフェクターから紐解く感染細胞内での卓越した宿主細胞最適化機構  | ○永井 宏樹 (大阪大学)            |
| 11:50 | S5-4 | ヘリコバクター・ピロリのヒトとの共進化から紐解く共生から病原性へのパラダイムシフト   | ○山岡 吉生 (大分大学 / ベイラー医科大学) |

第2会場 (展示室) \*会場は当日の客の入り具合によって後半に第1会場と入れ替えられる可能性があります。

**S6 日本原生生物学会共催シンポジウム**

**原生生物の環境センシングと運動**

**Protist Motility : sensing and responding to environmental signals**

**オーガナイザー：野田 悟子 (山梨大学)、矢吹 彬憲 (海洋研究開発機構)、  
島野 智之 (法政大学)**

- |       |      |                                 |                        |
|-------|------|---------------------------------|------------------------|
| 10:10 | S6-1 | 細胞性粘菌の濃度勾配センシングと走化性運動           | ○上田 昌宏 (大阪大学 / 理化学研究所) |
| 10:40 | S6-2 | 多機能運動装置ハプトネマが示す新規微小管系屈曲運動のメカニズム | ○稲葉 一男 (筑波大学)          |
| 11:20 | S6-3 | ケイソウの滑走運動機構                     | ○園部 誠司 (兵庫県立大学)        |
| 11:40 | S6-4 | テトラヒメナにおける空間形状への適応的遊泳           | ○中垣 俊之 (北海道大学)         |
| 12:00 | S6-5 | タイヨウチュウはどのように仲間とエサを見分けているのか?    | ○洲崎 敏伸 (神戸大学)          |

## 一般ポスター発表

各演題、2日間のコアタイムをお願いしております。

**10月23日(日) 13:10~16:10**

1分間ライトニングトーク：13:10~14:10頃 @街角討論会場  
コアタイム：一般会員 14:40~15:10、学生会員 15:10~16:10

**10月24日(月) 14:50~17:50**

コアタイム：奇数番号 14:50~16:20、偶数番号 16:20~17:50

### ポスター発表演題一覧

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
環境工学 Environmental engineering	ホワイエ 2F	P-001 土壤単離細菌による高濃度ディーゼルモデル化合物の生分解 筆頭著者：竹下 俊英 (横浜市大・国総学部・生命環境)
		P-002 有機硫黄汚染物質の生分解及び LC/ESI(-)-MS/MS を用いた二硫化物等の代謝産物の評価 筆頭著者：小澤 昂平 (横浜市大・国総学部・生命環境)
		P-003 高温条件が <i>Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'</i> 群集構造に与える影響 筆頭著者：道中 敦子 (国総研・下水道部)
		P-004 付加体の地下圏微生物によるメタン生成プロセスと分散型エネルギー生産システムの創成 筆頭著者：丸林 創 (静岡県・危機管理部)
		P-005 クーラントおよび廃油含有廃水からのメタンの回収 筆頭著者：山田 知加 (山形大・農)
		P-006 Metagenomics reveals metabolic capacity of methanogenic microbiota in a bioreactor treating soy sauce-processing wastewater 筆頭著者：Narihiro Takashi (Bioproduction Res. Inst., AIST)
		P-007 Stable Isotope Probing によるベンゼン、トルエン、ジクロロメタン複合汚染分解微生物の同定 筆頭著者：吉川 美穂 (産総研)
		P-008 海底堆積物中における CO <sub>2</sub> 応答微生物の特定と挙動モデル化の試み 筆頭著者：中村 孝道 (地球環境研・CO <sub>2</sub> 貯留)
		P-009 Substrate utilization kinetics and microbial community dynamics in solid-phase denitrification processes acclimated to different copolymers of polyhydroxyalkanoates 筆頭著者：Hiraishi Akira (Dept. Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. Tech.)
		P-010 亜酸化窒素還元に寄与する脱窒細菌の亜酸化窒素と酸素を巡るダイナミクスの動力学的評価 筆頭著者：末永 俊和 (東京農工大・院工)
		P-011 醤油製造廃水を処理対象とした低温 UASB 反応器内グラニューク汚泥の微生物群集構造解析 筆頭著者：當房 陸 (鹿児島工業高等専門学校)
		P-012 浄水処理における生物活性炭ろ過水中の微生物群集構造の深度方向変化 筆頭著者：鈴木 美有 (東大・院工・都市工)



セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
環境工学 Environmental engineering		P-013 活性汚泥内に存在する Candidate division 細菌群の FISH 法を用いた可視化 筆頭著者：西村 恭平 (広島大・院工)
		P-014 De novo meta-RNA-seq で混沌とした微生物コミュニティにおける微生物の働きや微生物同士の関係性をみる 筆頭著者：佐藤 由也 (産総研・環境管理)
		P-015 膜分離活性汚泥法による高濃度油含有実廃水処理の効率化に關与する候補微生物群 筆頭著者：田中 亮一 (熊本県産業技術センター)
		P-016 Shift between extracellular electron discharge and uptake by electrode-associated <i>Geobacter metallireducens</i> biofilms 筆頭著者：Kashima Hiroyuki (Dept. of Subsurface Geobiology Analysis and Research, JAMSTEC)
微生物間相互作用 Interaction between microorganisms	ホワイエ2F	P-017 <i>Lactobacillus plantarum</i> 環境単離株における莢膜合成量の変化に伴ったコロニー形態の相変異機構 筆頭著者：江橋 由夏 (筑波大院・生命環境)
		P-018 ウェルシュ菌におけるバイオフィーム細胞集団の不均一性 筆頭著者：尾花 望 (筑波大・生命環境)
		P-019 <i>Chromobacterium violaceum</i> はセンサーキナーゼを用いて多様な言語(AHL)に 応答する 筆頭著者：島村 裕子 (筑波大・院生命環境)
		P-020 超高速化量子分子動力学法に基づくマルチスケール計算化学によるバイオフィーム成長シミュレーション 筆頭著者：佐藤 亮 (東北大・NICHe)
		P-021 <i>Paenibacillus</i> 属細菌はバイオフィーム中に耐性の高い芽胞を形成する 筆頭著者：加藤 寛子 (筑波大・生物資源)
		P-022 環境中におけるメンブランベシクルを介した異種間相互作用の解析 筆頭著者：鬼澤 里奈 (筑波大院・生命環境)
		P-023 Protein aggregation and aging in fission yeast 筆頭著者：Nakaoka Hidenori (Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo)
		P-024 NRP がロドコッカス属細菌の集団形態を制御する 筆頭著者：茂木 亮介 (筑波大院・生命環境)
		P-025 細胞間情報伝達機構を介した集団化回避メカニズムの解明 筆頭著者：森永 花菜 (筑波大院・生命環境)
		P-026 菌体密度が微生物間相互作用に与える影響の解析 筆頭著者：勝亦 雄太 (筑波大院・生命環境)
		P-027 硫黄源が關与する枯草菌の寒天培地上のシアノバクテリアの増殖誘導能 筆頭著者：林 昌平 (島根大・生資)
		P-028 競争条件下における異属微生物の共存機構解明 筆頭著者：鈴木 研志 (静大・創造)
		P-029 クローナルな硝化菌集団における細胞増殖活性の不均一性の評価と機構解明 筆頭著者：一色 理乃 (早大 院先進理工)
		P-030 抗菌材表面に形成されるバイオフィーム -初期の性状変動- 筆頭著者：安田 怜子 (立命大・院生命)
		P-031 環境中のキノロン自然耐性菌/感受性菌についての考察 筆頭著者：馬場 理 (順天堂大学医学研究科 感染制御科学研究センター)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
環境工学 Environmental engineering	ホワイエ2F	P-032 難培養性微生物 <i>Nitrospira</i> の増殖促進、休眠・覚醒現象の解明 筆頭著者：村上 千穂 (広島大・院工)
		P-033 緑膿菌における地理的分布と Quorum sensing システムとの関連 筆頭著者：遠矢 正城 (筑波大・生命環境系)
		P-034 う蝕病原性細菌におけるスクロース依存的な細胞外 DNA 放出機構の解析 筆頭著者：井上 紗智 (筑波大・生物資源科学)
		P-035 Quorum-sensing 機構による亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrospira japonica</i> の活性制御メカニズム 筆頭著者：牛木 章友 (早大院・生医)
		P-036 Divergence of the biofilm architecture, component and microbiome involved in the fouling of membrane bioreactors 筆頭著者：稲葉 知大 (Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
		P-037 バイオフィーム間隙水中での微生物の増殖 筆頭著者：浅田 智也 (立命大・院生命)
生理 / 代謝 / 増殖 / 分類 Growth, metabolism, physiology and phylogeny of microorganisms	ホワイエ1F	P-038 湿地から分離した新規硫酸還元細菌 NAW-5 株の諸特性とグラム陽性硫酸還元細菌群の再分類の検討 筆頭著者：渡邊 美穂 (北海道大・低温研)
		P-039 ゲノム上に GC 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性アーキアの温度適応 筆頭著者：佐藤 悠 (静岡大・創造院)
		P-040 海洋プラスチックごみに付着していたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)分解細菌の特徴付け 筆頭著者：滝澤 玲香 (群馬大・院理工)
		P-041 大腸菌由来アセチル-CoA カルボキシラーゼを用いたマロニル-CoA の増産 筆頭著者：首藤 誉史 (茨城大・院農)
		P-042 クローンライブラリー法による徳島県産阿波番茶茶葉の微生物解析 筆頭著者：藤井 美月 (徳島大・総科・環境)
		P-043 超微小バクテリアの純粋培養とそのゲノム解析 筆頭著者：中井 亮佑 (遺伝研)
		P-044 セラミックス多孔体への乳酸菌付着性の評価 筆頭著者：田岡 洋介 (宮崎大・農)
		P-045 Complete genome analysis of a nonylphenol-degrading bacterium <i>Sphingobium cloacae</i> JCM10874 <sup>T</sup> 筆頭著者：Ootsuka Mina (United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)
		P-046 海洋性 <i>Pseudomonas</i> sp. の産生するセルラーゼの性状 筆頭著者：田中 大貴 (愛媛大 CMES)
		P-047 海洋中の 1,4-ジオキサン分解細菌の解析 筆頭著者：安部 智子 (東京電機大・理工)
		P-048 白神山地からの酵母分離株と清酒醸造酵母との性状比較 筆頭著者：森山 裕理子 (弘前大・院農)
		P-049 <i>Bradyrhizobium</i> sp. RD5-C2 においてクロロフェノキシ酢酸類の分解を担う遺伝子の同定 筆頭著者：田中 翔 (島根大・院生資)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
生理 / 代謝 / 増殖 / 分類 Growth, metabolism, physiology and phylogeny of microorganisms	ホワイエIF	P-050 白神山地土壌から分離した好酸性新規放線菌の系統分類学的研究 筆頭著者：殿内 暁夫 (弘前大・院農)
		P-051 白神山地土壌から分離した放線菌に関する研究 筆頭著者：ツァンバ オユンゲレル (弘前大・院農)
		P-052 白神山地土壌から分離した新規<I>Acidobacteria</I>門細菌に関する研究 筆頭著者：工藤 千沙希 (弘前大・院農)
		P-053 山形県飛島沿岸海水および海藻に生息する放線菌の探索 筆頭著者：堀 翔太 (山形大院・農)
		P-054 汽水湖から単離された新奇極小細菌の新種・新属提案に向けた解析 筆頭著者：前島 由明 (静大・工)
		P-055 Redox 環境の変化に適応できる津波堆積物由来の新規硫黄酸化細菌の特徴 筆頭著者：猪原 英之 (農工大・連合農)
		P-056 <i>ldhA</i> の確率的な発現による <i>persister</i> 形成と制御 筆頭著者：山本 尚輝 (早大院・先進理工・生医)
		P-057 微細気泡エアレーションが大腸菌のせん毛運動を抑制する 筆頭著者：山梨 由布 (群馬大学大学院 理工学府 環境創生)
		P-058 大腸菌の <i>persister</i> 形成を誘導する多様な経路 筆頭著者：河合 祐人 (早大・先進理工・生命医科)
		P-059 <i>Sphingobium barthaii</i> KK22 による多環芳香族炭化水素 (PAH) 生分解の化学的および遺伝的解析 筆頭著者：前田 亜鈴悠 (横市大・院理)
		P-060 ブタノール生産性 <i>Clostridium</i> 属細菌のゲノム情報に基づく発酵代謝系の分子遺伝学的解析 筆頭著者：上原 研人 (茨城大・院農)
方法論・情報・ゲノム解析 Methods for informatics and genomics of environmental microbiology		P-061 深海環境から分離した細菌の分類学的研究 筆頭著者：宮崎 征行 (海洋研究開発機構)
		P-062 Total RNAseq 法による生物集団構造とメタトランスクリプトームの同時解析 筆頭著者：坪井 亜里沙 (理研 環境資源セ)
		P-063 GHOSTX を搭載した MAPLE 2.3 による生理・代謝機能ポテンシャルの評価 筆頭著者：荒井 渉 (海洋研究開発機構・海底資源)
		P-064 改良型 MAPLE システムを用いた太平洋低緯度海域のメタゲノム解析 筆頭著者：高見 英人 (海洋機構・資源)
		P-065 次世代シーケンサと培養法による細菌叢の比較 筆頭著者：福永 栄 (株式会社 IHI)
		P-066 環境 RNA を用いた微生物相解析：熱水活動域チムニーの場合 筆頭著者：武藤 久 (京都大・院農)
		P-067 超微量環境 DNA からのメタゲノムライブラリー構築に関する技術的検討 筆頭著者：平井 美穂 (JAMSTEC)
		P-068 滑走性マイコプラズマ <i>Mycoplasma mobile</i> の運動機能解明に向けた大規模ゲノムクローニング 筆頭著者：大盛 佐和子 (筑波大・院生命環境)
		P-069 GeneFISH 法を用いて富士山地下水を対象に脱窒菌の機能遺伝子をシングルセルレベルで検出する試み II 筆頭著者：梶田 卓 (静岡大・院理)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
方法論・ 情報・ゲノム解析	ホワイエイ IF	P-070 PacBio RS II による完全長 16S rDNA 配列を用いた高解像度微生物群集構造解析 筆頭著者：佐藤 万仁 (沖縄綜研・研究開発)
		P-071 Construction of metagenome BAC library from mangrove soil using the incubation method 筆頭著者：Park Sanghwa (Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus)
		P-072 寒天培地表面への微細凹凸形成による微生物の培養制御の試み 筆頭著者：内山 茂 (理研・中村特別研究室)
		P-073 自動計測による微生物のサイズ・形状評価-卓上型 SEM を用いた微生物の解析- 筆頭著者：尾崎 温美 (ジャスコインタナショナル株式会社)
		P-074 w/o エマルジョンを利用したナノカルチャー技術の開発 筆頭著者：松倉 智子 (産総研・バイオメディカル)
		P-075 微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法 筆頭著者：植田 雄人 (広島大・院工)
方法論・観察と単離 Methods for observation and cultivation of environmental microbiology		
土壌生態系 Soil and terrestrial microbial ecology	市民ギヤラリー1	P-076 病原性フザリウムの共培養による土壌病害の発病抑止性に関わる土壌生物性の評価法の検討 筆頭著者：三星 暢公 (片倉コープアグリ株式会社 筑波総合研究所)
		P-077 東日本大震災の津波浸水による農地土壌微生物群集への影響の長期的解析 筆頭著者：浅野 亮樹 (秋田県大・生資)
		P-078 芳香族・脂肪族ポリエステルによる土壌微生物叢および植物成長への影響 筆頭著者：鈴木 美和 (群馬大・院理工)
		P-079 土のミクロ団粒内に見られる異形の細菌細胞群：その3 ナノ微生物？ 筆頭著者：服部 黎子 (アチックラボ)
		P-080 新規有機物資材を用いた土壌還元消毒における細菌群集構造の変化 筆頭著者：李 哲揆 (理研・BRC)
		P-081 土壌細菌群集によるリン可給化能の維持機構 筆頭著者：美世 一守 (東大・院農)
		P-082 土壌環境における <i>Burkholderia</i> 属細菌の生育段階と土壌高発現遺伝子の転写変動パターンとの関係性 筆頭著者：田上 諒 (東北大・院生命)
		P-083 多環芳香族炭化水素の混在のなかで起こる <i>Sphingobium barthaii</i> sp.strain KK22 による生分解についての解析 筆頭著者：井澤 陽 (横浜市大・大学院)
		P-084 下水汚泥中に存在する難培養高度好熱菌に関する研究 筆頭著者：藤本 遼 (九大院・生資環)
		P-085 茶園土壌に添加したササ・ススキの分解に伴う土壌理化学性と微生物群集構造の変化 筆頭著者：鮫島 玲子 (静岡大・学院農)
		P-086 比較プロテオミクスによるアラスカ永久凍土氷楔由来放線菌の休眠状態の代謝生理解析 筆頭著者：池 晃祐 (北大院農)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
土壌生態系		P-087 土壌細菌の多様性の標高変化に対する土壌特性と植物多様性の相対的重要性 筆頭著者：執行 宣彦 (東大・秩父演習林)
		P-088 不耕起栽培畑地土壌における耐水性団粒の微生物群集メタゲノム解析 筆頭著者：中根 麻冴美 (茨城大・院農)
海洋表層生態系 Ocean microbial ecology	市民ギョギョリー	P-089 春期ブルーム中の親潮黒潮移行域において活発に細胞分裂する細菌群集 (Active growing bacteria: AGB)の組成比較 筆頭著者：片岡 剛文 (福井県大海洋)
		P-090 RNA-seq データを活用した真核微生物群集構造の解明に向けた取り組み 筆頭著者：矢吹 彬憲 (海洋研究開発機構・多様性)
		P-091 微細藻類由来の溶存態有機物が沿岸性海洋細菌群集組成に及ぼす影響 筆頭著者：多田 雄哉 (JAMSTEC)
		P-092 超閉鎖性内湾の季節的な貧酸素化にともなう水柱細菌群集の組成変化 筆頭著者：鷺尾 昂祐 (長大院水環)
		P-093 真核微生物ラビリントラファ菌類の細胞外プロテアーゼプロファイル ～水圏での有機物分解者としてのポテンシャルを探るために～ 筆頭著者：大林 由美子 (愛媛大・CMES)
		P-094 真核生物ラビリントラファ菌類による珪藻からの栄養摂取 筆頭著者：浜本 洋子 (甲南大・院・自然科学)
		P-095 沖縄トラフ伊平屋北及び駿河湾の光合成微生物群集に対する熱水性鉱石からの溶出成分の影響 筆頭著者：坪井 隼 (国環研・生物セ)
		P-096 培養条件によるラビリントラファ菌類が分泌するセルラーゼ活性と外質ネットの形態の違い 筆頭著者：岩田 いつみ (甲南大・院・自然科学)
		P-097 カレニア・シャットネラブルーム細菌分画のメタゲノム解析 筆頭著者：北村 徳一 (遺伝研)
		P-098 培養株から見えてくる淡水圏の浮遊細菌の特徴とその生態 筆頭著者：渡邊 圭司 (埼玉県・環科国セ)
陸水の生態系 Freshwater microbial ecology		P-099 淡水湖沼より分離した新規好酸性細菌の特徴づけ 筆頭著者：岡本 怜 (北大・低温研)
		P-100 Analysis of microbial community of red snow from alpine snowfields 筆頭著者：Terashima Mia (Inst. Low Temp. Sci., Hokkaido Univ.)
		P-101 多摩川上流の河床礫上バイオフィームに優占する好気性光合成細菌 筆頭著者：広瀬 節子 (首都大・院生命)
		P-102 印旛沼の微生物ループにおける <i>Limnohabitans</i> 属の生態学的役割 筆頭著者：三角 恭平 (東大院・工、都市工)
		P-103 国内の大水深淡水湖に生息する細菌群集の網羅的分析 筆頭著者：岡崎 友輔 (京大大学生態学研究センター)
		P-104 Cultivable proteolytic bacteria and their proteases in three Antarctic freshwater lakes 筆頭著者：Matsui Mihoko (Soka Univ.)
		P-105 河床礫バイオフィームにおいて共存する緑藻の生育を抑制する好気従属栄養性細菌 筆頭著者：高城 遥 (首都大・院生命)



セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
熱水・地熱環境の生態系 Microbial ecology in thermal environments	市民ギャラリー1	P-106 深海底熱水活動域に普遍的に生息する化学合成独立栄養細菌の生物地理学的特徴の解明 筆頭著者：美野 さやか (北海道大・院水)
		P-107 深海底熱水活動域から分離した新規イプシロンプロテオバクテリアの生理生態学的性状 筆頭著者：永田 亮佑 (京都大・院農)
		P-108 好熱性シアノバクテリアにおける非増殖高温領域での生残 筆頭著者：川村 のぞみ (首都大学東京・院・生命)
		P-109 Ecological insights into hot spring microbial mats: undermat community analysis using NGS sequencing. 筆頭著者：Thiel Vera (Dept. of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University)
		P-110 好熱単細胞性シアノバクテリアと糸状性光合成細菌との共培養によるバイオフィルム形成 筆頭著者：河合 繁 (首都大・院生命)
		P-111 水素生成型一酸化炭素資化性好熱菌の分離およびゲノム解析 筆頭著者：大黒 達希 (京大・院農)
		P-112 深海性メタン酸化細菌のバイオフィルムにおける遺伝子発現 筆頭著者：高木 善弘 (海洋研究開発機構)
		P-113 Detection of nitrogenase activity and nifH genes in microbial streamer communities in sulfidic hot springs at Nakabusa, Japan 筆頭著者：西原 亜理沙 (Grad, Sch, Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University)
		P-114 深海熱水活動域からの多様な好気性メタン酸化細菌の集積培養と単離 筆頭著者：平山 仙子 (海洋研究開発機構)
		P-115 地球における生命誕生に必須な含窒素有機物はどのように準備されたか？ 筆頭著者：高井 研 (海洋研究開発機構)
		アストロバイオロジー / 生命の起源 / 大気圏 Astrobiolology/origin of life/atmospheric habitats
P-117 A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile 筆頭著者：布浦 拓郎 (海洋研究開発機構)		
P-118 たんぼぼ計画の進行状況：微生物曝露実験と微生物捕集実験を中心として 筆頭著者：横堀 伸一 (東京薬大・生命)		
P-119 蛍光顕微鏡を用いた火星生命探査における蛍光色素系の確立 筆頭著者：村野 由佳 (東薬大・生命)		
P-120 立山と富山平野で採取した大気試料中の微生物群集構造 筆頭著者：田中 大祐 (富山大・院理工)		
P-121 雨水細菌叢の季節性変動解析から明らかにする大気中の微生物長距離移動 筆頭著者：平岡 聡史 (東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻)		
P-122 立川市の大気浮遊細菌の季節変動と生態系に与える影響 筆頭著者：植竹 淳 (国立極地研究所)		

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
アストロバイオロジー / 生命の起源 / 大気圏		P-123 黄砂およびPM2.5の沈着地におけるバイオエアロゾルの微生物群集構造の変化 筆頭著者：牧 輝弥 (金沢大理工)
		P-124 陸棲藍藻 <i>Nostoc</i> sp. HK-01 (NIES-2109)のドラフトゲノム解析 筆頭著者：加藤 浩 (三重大・生命セ)
		P-125 「惑星居住科学」における宇宙環境微生物学研究 筆頭著者：山口 進康 (大阪府立公衛研)
土壌の物質循環 Material cycle in soil environments	市民ギヤラリー	P-126 マングローブ林土壌中のメタン生成菌群集が示す特徴的な機能 筆頭著者：新井 宏徳 (国際農研・JSPS)
		P-127 人工水田土壌のメタン生成活性と微生物群集に及ぼす土壌構成要素の影響 筆頭著者：村瀬 潤 (名古屋大・院生命農)
		P-128 水田土壌から分離されたメタン生成古細菌によるバイオシリカ形成 筆頭著者：海野 裕晃 (名古屋大・院生命農)
		P-129 水田土壌より分離した水素生成細菌株の <i>hydA</i> 転写活性はパラログ間で異なる 筆頭著者：馬場 竜子 (名古屋大・院生命農)
		P-130 Effect of various ecological conditions and land use on microbiological processes in connection with C-and N-cycles 筆頭著者：Katai Janos (Fac. Ag. Food. Envir., Univ. Deb., Hung)
		P-131 放線菌フランキアの窒素固定変異株のスクリーニングと特徴づけ 筆頭著者：松山 伸太朗 (鹿児島大・院理工)
		P-132 水田土壌に優占する微生物の新機能:鉄還元菌こそが窒素循環に重要である Iron reducing bacteria are principal drivers of nitrogen transformation in rice paddy soil 筆頭著者：増田 曜子 (東京大・院農)
		P-133 水田の真核生物相とメタン発生量の経時変化 筆頭著者：酒井 順子 (農研機構・農業環境センター)
		P-134 メタン酸化が駆動する水田の微生物食物連鎖の構造は根圏と非根圏で異なる 筆頭著者：日比野 優子 (名古屋大・院生命農)
		P-135 ダイズ圃場からの収穫期前後における N <sub>2</sub> O 発生源の特定と土着ダイズ根粒菌混合菌株利用による N <sub>2</sub> O 発生削減 筆頭著者：星野 裕子 (農研機構 農業環境変動研究センター)
		P-136 ヒ酸呼吸細菌 <i>Anaeromyxobacter</i> sp. PSR-1 株のヒ酸還元酵素について 筆頭著者：殿村 美森 (千葉大・院園芸)
		P-137 アンモニア酸化古細菌 <i>Nitrososphaera viennensis</i> 由来の銅含有型亜硝酸還元酵素 NirK の異種発現および酵素学的解析 筆頭著者：小林 駿 (長岡高専・環境都市工学科)
		P-138 脱塩素化細菌 <i>Geobacter</i> sp. AY 株が保有する脱塩素酵素の機能解析 筆頭著者：小林 直央 (長岡高専・環境都市工学科)
		P-139 Soil microbial community structures and activities in relation to nitrogen cycling in two contrasting soils in Malawi - community responses to added carbon 筆頭著者：Chiba Akane (Grad. Sch. of Agri., Hokkaido Univ.)
		P-140 硫黄添加堆肥における pH 低下およびアンモニア揮散抑制に寄与する硫黄酸化細菌の生態 筆頭著者：森 裕美 (東北大・院農)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
土壌の物質循環 Material cycle in soil environments	市民ギャラリー	P-141 三宅島初成土壌に生育するパイオニア植物根域のニトロゲナーゼ活性と根圏細菌の解析 筆頭著者：海老原 諒子 (茨城大・農)
		P-142 北方林における積雪パターンの変化に対する微生物群集の応答 筆頭著者：岡 裕章 (東京大・院農)
		P-143 低アンモニア条件下での土壌還流法におけるアンモニア酸化菌の動態解析 筆頭著者：金本 美穂 (茨城大学)
		P-144 スイカ畑土壌, 谷津田水田土壌から oligotrophic な <i>Nitrosospira</i> sp. の分離 筆頭著者：堺 奎介 (中大院・理工)
水圏の物質循環 Material cycle in aquatic environments		P-145 メタゲノム解析から見える富栄養湖の窒素循環に関与する anammox の実態 筆頭著者：福原 康平 (中央大・院理工)
		P-146 16S rDNA に基づくメタゲノム解析による厚岸湖アマモ群落における亜酸化窒素低減微生物の探索 筆頭著者：イー サイキヤット (日大院・生資科)
		P-147 海底直上水中の溶存酸素濃度は表層堆積物における細菌群集構造変化の主要な environmental driver か？ 筆頭著者：森 郁晃 (長崎大・院水環)
		P-148 新規海洋性 DMS・DMSO 資化性菌のドラフトゲノムの決定とその諸性質 筆頭著者：高橋 智 (芝浦工大・院)
		P-149 多様なメタン酸化細菌が好む環境 筆頭著者：蒲原 宏実 (広島大・院工)
		P-150 深海堆積物における亜硝酸酸化細菌の分布 筆頭著者：峯岸 宏明 (海洋機構)
		P-151 微生物凝集体ソーティングによる未培養な亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrotoga</i> の獲得と生存戦略 筆頭著者：石井 拳人 (早大・院生医)
地下環境の物質循環 Material cycle in subsurface environments		P-152 海底泥火山メタンブルーム中の微生物群集構造 筆頭著者：砂村 倫成 (東大・院理)
		P-153 付加体の深部帯水層におけるメタン及び窒素ガス生成プロセスの地域特性 筆頭著者：松下 慎 (静岡大・創造院環境)
		P-154 沖縄本島に分布する付加体の深部帯水層におけるメタン生成メカニズム 筆頭著者：眞柄 健太 (静岡大・院・総合)
		P-155 地下帯水層生態系における rare biosphere の群集形成に寄与する地球化学的要因 筆頭著者：山本 京祐 (産総研・生物プロセス)
		P-156 地下水におけるウイルスの原核生物群集制 II 筆頭著者：双木 笙太 (静岡大・院理)
		P-157 海底堆積物に生息する微生物ダークマター-Chloroflexi 門細菌の分離・培養 筆頭著者：中原 望 (長岡技大・院)
		P-158 深海底堆積環境におけるメタノールの嫌氣的分解 筆頭著者：柳川 勝紀 (九大・比文)
		P-159 山形県庄内沿岸汽水域堆積物に生息する嫌氣的メタン酸化微生物の活性および多様性評価 筆頭著者：佐々木 捺実 (山形大・農)



セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
地下環境の物質循環 Material cycle in subsurface environments	市民ギャラリー1	P-160 水溶性天然ガス田においてメタノール分解のみを担う新規メタン生成アーキアの分離同定 筆頭著者：持丸 華子 (産総研)
		P-161 深部地下油層環境における生物的原油分解メタン生成メカニズムの解明 筆頭著者：眞弓 大介 (産総研)
		P-162 Identifying methanogenic microbial community members obtained from 2-km deep subseafloor coalbed 筆頭著者：田角 栄二 (JAMSTEC)
		P-163 IODP 東北地方太平洋沖地震調査掘削(JFAST)で得られたコア試料の微生物解析 筆頭著者：酒井 早苗 (海洋研究開発機構)
P-164 深海底での微生物現場培養実験から紐解く鉄を基盤とした海底下微生物圏：放射光源 X 線分析法を駆使した微生物による地殻内エネルギー獲得戦略の解明 筆頭著者：大橋 優莉 (静岡県大・院環境)		
P-165 異化的ヒ酸還元細菌によるヒ素ストレス応答機構の発現解析 筆頭著者：土屋 達哉 (千葉大院・園芸)		
P-166 嫌氣的従属栄養性鉄酸化細菌の集積培養 筆頭著者：細田 晃文 (名城大・農)		
P-167 硫酸塩・Fe(III)還元を伴う嫌氣的トルエン分解微生物群集の構造解析 筆頭著者：佃 怜奈 (岐大・院応生科)		
P-168 Microorganisms on iron mineral particles in the Fe(II) rich hot spring 筆頭著者：Idei Airi (Grad. Sch. of Bio., Tokyo Metropolitan Univ.)		
P-169 現場培養による深海性鉄利用微生物の解明 筆頭著者：鈴木 優美 (神奈工大・院工)		
P-170 土壌環境のヒ素挙動に関与する微生物群集機能の解明 筆頭著者：濱村 奈津子 (九州大・院理)		
P-171 深海熱水活動域での酸化鉄被膜形成に関わる微生物 筆頭著者：牧田 寛子 (JAMSTEC)		
電気と微生物 Microbiology with electricity		P-172 電気産生微生物群集における電極の酸化還元電位の変化に対する多様な遺伝子発現応答 筆頭著者：石井 俊一 (海洋研究開発機構)
		P-173 電極上に形成されるシュワネラ菌のバイオフィームと電極電位の関係 筆頭著者：北山 実穂 (東薬大・院生命)
		P-174 海洋単離株 FT01 は金属腐食を引き起こして鉄飢餓状態を脱する 筆頭著者：渡辺 宏紀 (筑波大院・生命環境)
		P-175 発酵的 ATP 合成を行う嫌気呼吸：Shewanella oneidensis MR-1 における細胞外電子移動 筆頭著者：徳納 吉秀 (東京大・院工)
		P-176 Bacillus 属細菌による金属腐食の解析 筆頭著者：山本 達也 (筑波大・生命環境)
	P-177 炭素材料の酸化による汚水からの生物学的電流回収の促進 筆頭著者：吉田 奈央子 (名工大・院工)	

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)	
光と微生物 Microbiology with light	市民ギャラリー1	P-178 特定波長の太陽光線が海洋に遍在する <i>Thaumarchaeota</i> 門古細菌の有光層における分布へ与える影響の評価 筆頭著者：伊知地 稔 (東京大・大海研)	
		P-179 海洋性フラボバクテリアにおける、プロテオロドプシンを介した光利用と光防御のトレード・オフ 筆頭著者：熊谷 洋平 (東京大学 大気海洋研究所)	
		P-180 紅色光合成細菌 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> における炭素源飢餓条件下での光合成遺伝子の発現 筆頭著者：菅野 菜々子 (首都大・院生命)	
		P-181 光受容体を介した <i>Methylobacterium</i> 属細菌の光応答の解析 筆頭著者：井口 博之 (京都学園大・バイオ環境)	
		P-182 光合成滑走細菌 <i>Chloroflexus aggregans</i> の青色光による運動抑制と逃避行動 筆頭著者：福島 俊一 (首都大学東京)	
		P-183 光波長制御による微生物マット相互作用の解明 筆頭著者：西田 暁史 (東工大・院情)	
共生・理論 Symbiosis & ecological theory			P-184 偏性共生細菌ゲノムにおける進化選択圧の解析 筆頭著者：金城 幸宏 (東工大・院生命理工)
無脊椎動物-微生物相互作用 Microbial Interaction with invertebrate		P-185 Characteristics of the fatty acid composition in the bathyal <i>Calypptogena</i> clam, <i>C. octanii</i> : difference in trophic relationship between surface and vent clams 筆頭著者：齋藤 洋昭 (Ishikawa Prefectural University)	
		P-186 アワビ消化管より単離された <i>Arcobacter</i> 属細菌のゲノム解析による機能解明 筆頭著者：水谷 雪乃 (三重大院生資)	
		P-187 深海底熱水活動域に生息する固有甲殻類の共生器官“腹部剛毛”の構造的特徴 筆頭著者：藤吉 奏 (京都大・院農)	
		P-188 ゴエモンコシオリエビの外部共生菌相を用いた環境影響評価方法の構築 筆頭著者：和辻 智郎 (海洋研)	
		P-189 浅海性無脊椎動物のマイクロバイオーム：特異 <i>Helicobacter</i> の発見と飼育実験 筆頭著者：齊藤 ひかり (京大院・農)	
	P-190 海水性白点虫を対象とした簡易検出法の開発 筆頭著者：高崎 一人 ((株)ファスマック)		
	P-191 Uncovering rare candidate bacterial phylum TG2 in the termite gut 筆頭著者：Utami Yuniar D. (Grad. Sch. of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech.)		
	P-192 シロアリ腸内原生生物の細胞表面に共生する <i>Treponema</i> 属細菌3種のシングルセルゲノム解析 筆頭著者：雪 真弘 (理研 CSRS)		
	P-193 長期に隔離された共生微生物群集では群集レベルの競争が生じるか？ 筆頭著者：北出 理 (茨城大・理)		

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
無脊椎動物-微生物相互作用 Microbial Interaction with invertebrate	市民ギャラリー2	P-194 セン毛虫 <i>Tetrahymena thermophila</i> の細胞外分泌物が細菌の群集構造に及ぼす影響 筆頭著者：多羅尾 光徳 (東京農工大学・院農)
		P-195 シロアリ腸内原生生物の細胞表面に共生する新規 <i>Endomicrobium</i> 属細菌 筆頭著者：伊澤 和輝 (東工大 院生命理工)
		P-196 シングルセルトランスクリプトームに基づくイエシロアリ共生原生生物の機能解明 筆頭著者：西村 祐貴 (理化学研究所 バイオリソースセンター)
		P-197 シロアリ腸内原生生物に共生する <i>Desulfovibrio</i> 属細菌のゲノム解析による3者間共生システムの解明 筆頭著者：桑原 宏和 (東工大・生命理工学院)
		P-198 マルチオミクス解析でサンゴと微生物の相互作用を推定する 筆頭著者：丸山 徹 (早大院・先進理工)
		P-199 シロアリ腸内原生生物細胞表面共生細菌の <i>microdiversity</i> 解析にもとづく伝播様式についての考察 筆頭著者：猪飼 桂 (東工大・生命理工)
		P-200 氷河に特化した無脊椎動物の共生細菌群集構造解析 筆頭著者：村上 匠 (東工大 院生命理工)
		P-201 シロアリ腸内原生生物のメタン菌細胞内共生による同所的種分化の可能性 筆頭著者：酒井 海帆 (東工大・院生命理工)
		P-202 環境から獲得される細胞内共生細菌：ナガカメシ類で見つかった腸内共生から細胞内共生へのミッシングリンク 筆頭著者：竹下 和貴 (産総研・生物プロセス)
		P-203 <i>Burkholderia</i> のヒミツの姿～ <i>Burkholderia</i> 細胞壁合成不全変異株はホソヘリカメシ共生時に異常な細胞形態を示す 筆頭著者：後藤 栞 (北大・院農)
		P-204 メタゲノムのアプローチによる生理活性物質を生産する海綿共生微生物の探索 筆頭著者：田中 志貴子 (琉球大・熱生研)
		P-205 カブトムシ幼虫腸管内細菌叢と代謝産物 筆頭著者：和田 典子 (日大・生資科・くらしの生物)
		P-206 <i>Burkholderia</i> 細菌の昆虫腸内への適応機構の解明 筆頭著者：大林 翼 (北大・農)
		P-207 Investigation of gut microbiota of green dock beetles of the genus <i>Gastrophysa</i> 筆頭著者：大坪 和香子 (Grad. Sch. Agr. Sci., Tohoku Univ.)
		脊椎動物-微生物相互作用 Microbial Interaction with vertebrate
P-209 ヒト腸管ムチンに存在する硫酸還元細菌の探索 筆頭著者：秋葉 練介 (東北大・院農)		
P-210 MiSeq を用いたヒト毛髪に付着する細菌群集構造解析 筆頭著者：渡邊 康太 (九大院・生資環)		
P-211 桧原湖北部に存在する大腸菌の <i>lacZ</i> 部分塩基配列に基づいた由来の推定 筆頭著者：野田 真優子 (福島大・院理工)		
P-212 Mouse gut microbiota composition is altered by elemental diet and pancrelipase treatment 筆頭著者：Nishiyama Hiroki (Laboratory of Chemical Life Center, BIC, ICR, Kyoto Univ.)		

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)		
植物-微生物相互作用 Microbial Interaction with plant	市民ギヤラリー2	P-213 非マメ科植物への根粒形成能付与の試み 筆頭著者：三輪 大樹 (農工大・院農)		
		P-214 Rhizobial genes involved in the symbiosis with host legumes 筆頭著者：Nguyen Hien P. (Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)		
		P-215 水稻種子に共生する窒素固定細菌の動態と窒素固定能に関する研究 筆頭著者：蓑田 尚人 (鹿児島大・農)		
		P-216 Genetic Diversity and Symbiotic Phenotype of Hairy Vetch Rhizobia in Japan 筆頭著者：元 坤 (東京農工大学・連合農学)		
		P-217 放線菌 <i>Frankia</i> の細胞表層多糖の変化が窒素固定と共生に及ぼす影響 筆頭著者：九町 健一 (鹿児島大・院理工)		
		P-218 ジャガイモ葉から分離された <i>Methylobacterium</i> 属細菌の多様性 筆頭著者：染谷 信孝 (農研機構・野菜花き研)		
		P-219 大気水素が紡ぐ共生関係: 空中の水素を取り込む植物共生微生物の生態の解明 筆頭著者：菅野 学 (産総研・生物プロセス)		
		P-220 真菌類菌糸圏から分離した <i>Burkholderia</i> 属細菌のキチン分解活性について 筆頭著者：中西 布実子 (茨城大学・院農)		
		P-221 山崩れによりかく乱された御嶽山における根粒と根圏土壌中のフランキアの群集構造 筆頭著者：池邊 茉莉 (鹿児島大・院理工)		
		P-222 <i>Mortierella</i> 属菌に内生する細菌 <i>Mycoavidus</i> spp. が宿主の孢子嚢形成に与える影響について 筆頭著者：高島 勇介 (東京農工大院・連合農学)		
		P-223 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 病原力関連遺伝子の網羅的解析と感染機構の可視化 筆頭著者：丸山 望 (筑波大・院・生命環境)		
		P-224 A dark septate endophyte <i>Veonaeopsis simplex</i> Y34 alters the root-endospheric community and suppresses Fusarium crown and root rot disease of tomato 筆頭著者：Guo Yong (Ibaraki University College of Agriculture)		
		P-225 Comparative genomics of two betaproteobacterial endohyphal symbionts: <i>Mycoavidus cysteinexigens</i> and <i>Burkholderia rhizoxinica</i> . 筆頭著者：Sharmin Dilruba (Ibaraki University, College of Agriculture)		
		P-226 Effect of dark septate endophytic fungi treatment on the belowground microbial community of the Allium plant 筆頭著者：Sun Han (Grad. Sch. of Agri., Ibaraki Univ. )		
		P-227 Microbial community structure and soil properties in the rhizosphere of understory dwarf bamboo in <i>Betula ermanii</i> forest, northern Japan 筆頭著者：Kong Bihe (ILTS., Hokkaido Univ., Japan)		
		水圏植物-微生物相互作用		P-228 難培養性細菌群 <i>Armatimonadetes</i> 門に属する新規細菌 LA-C6 株によるウキクサ亜科植物の生育促進 筆頭著者：岩下 智貴 (山梨大・工)
				P-229 ウキクサの葉状体と根に集積するフェノール分解菌の分離と比較 筆頭著者：大内 源樹 (山梨大・生命環境)

セッション	会場	ポスター番号 演題 筆頭著者 (所属)
水圏植物-微生物相互作用 Microbial Interaction with aquatic plant		P-230 水生植物ウキクサの成長を促進する新規 <i>Acidobacteria</i> 門細菌 F-183 株と TBR-22 株の生理性状および共生的機能の解析 筆頭著者：米田 恭子 (産総研・生物プロセス)
		P-231 水生植物ウキクサからの難培養性細菌群 <i>Verrucomicrobia</i> 門細菌および <i>Armatimonadetes</i> 門細菌の分離培養 筆頭著者：戸澤 恵里奈 (山梨大・生命環境)
		P-232 概日時計機構を有するウキクサ根圏微生物の探索 筆頭著者：寺戸 菜穂 (北大院農)
ウイルス / モバイルエレメント Virus and mobile elements	市民ギャラリー2	P-233 あなたのウイルスゲノムを分類します 筆頭著者：西村 陽介 (京都大・院農)
		P-234 超好熱古細菌 <i>Aeropyrum pernix</i> に感染する新規溶原化ウイルスの増殖様式に関する一考察 筆頭著者：弓矢 真穂 (京都大・院農)
		P-235 Genome sequences of two giant viruses infecting <i>Prymnesium kappa</i> (Haptophyta) 筆頭著者：Blanc-Mathieu Romain (Bioinformatics Center, Kyoto Univ.)
		P-236 Formation and stability of extracellular antibiotic resistance plasmid pool in seawater under existence of ciliate and heterotrophic nanoflagella 筆頭著者：Bien Thi Lan Thanh (Ehime University)
		P-237 長期調査による珪藻とそれに感染するウイルスの生態学的関係の解明 筆頭著者：木村 圭 (佐賀大・低平沿岸セ)
		P-238 シロアリ腸内ファージメタゲノム解析と宿主腸内細菌の同定 筆頭著者：麥島 雄太 (東工大・院生命理工)
		P-239 プロファージ遺伝子による <i>Paracoccus denitrificans</i> の MV 産生 筆頭著者：安田 まり奈 (筑波大・生命環境学群)
		P-240 海洋細菌ゲノム上でマクロライド耐性遺伝子 <i>mef(C)</i> - <i>mph(G)</i> を担う ICE の解析 筆頭著者：杉本 侑大 (愛媛大・CMES)
		P-241 飢餓状態の菌および貧栄養環境での遺伝子水平伝播 筆頭著者：香山 義明 (愛媛大・院農)
		P-242 カンキツかいよう病菌に感染する大型ファージ XacN1 のゲノム解析による特徴づけ 筆頭著者：吉川 元貴 (京都大・化研・バイオインフォマティクスセンター)
		P-243 genomic-OTU を用いたメタゲノム解析による海洋ウイルスの季節変動 筆頭著者：綿井 博康 (京都大・院農)
		P-244 <i>Heterosigma akashiwo</i> virus 配列解析と Phycodnaviridae 再定義 筆頭著者：植木 尚子 (岡山大・植物研)
		P-245 プラスミドを持つ宿主の fitness (適応度) を増加させる原因因子の同定 筆頭著者：片岡 大亮 (静大院・総合科技・工)
		P-246 放線菌由来ウイルス様粒子による広宿主域水平遺伝子伝播 筆頭著者：鈴木 誠治 (東京海洋大・院)
		P-247 超好熱古細菌 <i>Pyrobaculum</i> 属に感染する新規ウイルス 2 種の分離 筆頭著者：望月 智弘 (東工大・地球生命研(ELSI))
		P-248 イプシロンプロテオバクテリアが産生する細胞外膜小胞の形態学的・遺伝学的特徴 筆頭著者：吉田 ゆかり (海研機構)
		P-249 一本鎖 DNA ウイルス群を標的とする定量的メタゲノミクス 筆頭著者：吉田 光宏 (海洋機構)

## シンポジウム出張ポスター発表

日時：10/24 (月) 14:50-17:50

会場：市民ギャラリー2

セッション	会場	ポスター番号 演題 発表者 (所属)
シンポジウム出張 Symposium branch	市民ギャラリー2	P-S2 Ecology of <i>Campylobacter</i> and <i>Arcobacter</i> pathogens in a freshwater lake environment 発表者：石井 聡 (ミネソタ大学、USA)
		P-S2-1 Phytase-producing bacteria from Chilean hydrothermal environments 発表者：Milko Jorquera (ラフロンテラ大学、Chili)
		P-S4-3 宿主を殺さず共存するウイルスを網羅する時代へ 発表者：浦山 俊一 (海洋研究開発機構)
		P-S6 原生生物の環境センシングと運動 発表者：野田 悟子 (山梨大)、矢吹 彬憲 (海洋研究開発機構)



## 高校生ポスター発表

日時：10/23(日) 13:10-16:10

会場：市民ギャラリー2

演題番号	発表タイトル	校名
H-01	ミドリゾウリムシ( <i>Paramecium bursaria</i> )の走光性	神奈川県立横須賀高等学校
H-02	イカから採取した発光細菌の培養	横須賀学院高等学校
H-03	イシクラゲを喰らう	神奈川県立平塚農業高等学校
H-04	ミドリムシの利用に関する研究	神奈川県立平塚農業高等学校
H-05	廃材を用いたキノコ作り	神奈川県立平塚農業高等学校
H-06	除菌スプレーと合成洗剤の食中毒菌におよぼす除菌効果	山村学園山村国際高等学校
H-07	ミントタブレットの口腔細菌におよぼす抗菌効果	山村学園山村国際高等学校
H-08	香辛料の食中毒原因菌におよぼす抗菌効果	山村学園山村国際高等学校
H-09	風評被害から地元の牛乳を守る	福島県福島市渡利中学校
H-10	身近に眠るバイオマス	横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校
H-11	そら飛べ！？センチュウ	神奈川県立西湘高等学校
H-12	二価鉄イオン( $Fe^{2+}$ )を用いて合成する光触媒がもたらす作用と効果	神奈川県立海洋科学高等学校
H-13	クマムシの熱耐性について	神奈川県立弥栄高等学校
H-14	カイコの常在菌の特徴	横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校
H-15	麴菌はどのようにして他個体を認識しているのか	横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校
H-16	冬虫夏草	神奈川県立神奈川総合産業高等学校
H-17	センチュウ ( <i>C.エレガンス</i> ) による漢方薬の機能評価	神奈川県立神奈川総合産業高等学校
H-18	身の回りのアオカビを用いたペニシリンの抽出	神奈川県立神奈川総合産業高等学校
H-19	ハイドロゲル・二価イオンを利用したカプセルの実用化の研究	神奈川県立平塚農業高等学校初声分校
H-20	粘菌の発生に関する観察と孢子からの再生	神奈川県立鶴見高等学校

# 講演要旨



## 2016年度 日本微生物生態学会奨励賞 受賞記念講演

### カメムシ類の腸内共生細菌に関する研究 ～垂直伝播を伴わない昆虫内部共生系の発見、そしてその発展～

○菊池 義智

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

地球上の生きとし生けるものは皆それぞれ単独で生きているわけではなく、互いに影響を及ぼし合いながら生きている。その究極的な形は、ある生物の体内に微生物が生息する「内部共生」にみることができ、そこでは宿主と共生微生物が高い空間緊密性のもと相互作用をしている。多くの場合において共生者は宿主の栄養代謝において重要な役割を果たし、宿主生物の生態と進化に大きなインパクトを与えてきた。

昆虫は100万種以上が知られる多様な生物群であり、実にその半数以上が内部共生微生物を持つと言われている。これまでにさまざまな昆虫の共生微生物が調査されてきたが、それらは共通で共生微生物の母子間伝播を伴い、共生微生物は昆虫の体内環境に高度に適応しているために単離培養が難しい（培養不可）という特徴を持っている。これら昆虫の共生微生物には顕著なゲノム縮退もみられ、共生の進化機構のみならず微生物のオルガネラ化を研究する上でも格好の研究対象となってきた。その一方で、縮退したゲノムは共生微生物の単離培養、ひいては遺伝子組換えを阻み、これによって昆虫における内部共生の分子基盤に関する研究は長らく停滞してきたと言える。私はダイズの重要害虫としても知られるホソヘリカメムシについて研究を行い、このカメムシが多くの昆虫とはまったく異なる共生システムを有し、共生微生物が培養可能で遺伝子組換えが容易であることを発見した。

ホソヘリカメムシは消化管後部に「盲嚢」と呼ばれる袋状の組織を多数発達させ、その内腔に *Burkholderia* 属の共生細菌を保有している。私はさまざまな飼育実験により、このカメムシが *Burkholderia* 共生細菌を垂直伝播させることなく、毎世代土壤中から獲得することを明らかにした。また培養試験や遺伝子解析から、この *Burkholderia* 共生細菌は様々な土壤環境に普通に見られ、多くのカメムシ類と共生することも分かってきた。現在、ホソヘリカメムシと *Burkholderia* の共生系は「内部共生の新規モデル系」として市民権を獲得しつつあり、宿主と共生微生物の両面から内部共生現象の生態、進化、分子基盤の理解を目指し研究を進めている。講演では上記の発見を端緒として私が明らかにしてきた内部共生の新事実について紹介するとともに、今後の展望についてもお話ししたい。

## 2016年度 日本微生物生態学会奨励賞 受賞記念講演

### 医科微生物生態学の創成に関する研究

- そして次に何をを目指すのか -

○丸山 史人

(京都大学・医学研究科)

微生物にとって、ヒト環境も自然環境のひとつであり、他の微生物、宿主との相互作用を通じて生息しています。ヒトではいわゆる病原細菌が着目され研究されていますが、実際にはほとんどがヒトに危害を加えない状態で生息しています。これらはヒトに疾患を引き起こしますが、これまで技術的な困難、コッホの原則に基づく医科細菌学の慣習からほとんど研究されてこなかった大きな課題が残されています。ヒトの感染症の8割は複数種の微生物が関わる複合微生物感染症によって引き起こされています。この複合感染症では原因菌が感染部位の表面にバイオフィルムを形成し、抗生物質などの治療に対して難治性化することが問題となっています。これまで、どのような細菌種で構成されることが発症、慢性化において必要なのか明らかになっている例はほとんどなく、その発症機構の解明や治療法の開発が望まれています。しかし、多数の種が疾患に関与し、原因菌種の絞込みもできていないこと、培養法が存在しない細菌種が関与することが研究を困難としてきました。

そこで、私は自然環境微生物学では常識である“自然環境中の微生物は、培養できないのが当然である”という概念を従来の医学細菌学に持ちこみました。すなわち、これらのヒトを含む自然環境中の微生物は、培養できないことが当然であると考えました。そこで、得られた成果は、感染症の8割を占める難治性複合感染症治療法の開発に向けた基盤となるものでした。そして、他の複合感染症においても導入可能な取り組みであり、これまで研究が困難で見過ごされていた複合感染症に関する研究分野、医科微生物生態学、を开花させることができると確信しています。

この研究過程で見えてきたことは、個々の微生物を理解するには、集団の理解が必要であり、さらには環境も合わせて理解することが必要であることです。すなわち共生体総体、ホロビオンを考慮すること、そして、その生物間相互作用は安定すること無く揺らぐものであり、協力と競争の関係が同じ生物種同士でも環境や場合によって異なる、共創関係（Amphibiosis）であること意識していくべきだと考えています。これが新しい人工生態系の構築、そして複合感染症のようなロバストな生態系の破壊に必要なだといえます。この観点から、現在取り組んでいる課題、今後の方向性を紹介致します。

## 2016年度 M&E 論文賞 受賞記念講演

### 授賞論文

***Burkholderia* of Plant-Beneficial Group are Symbiotically Associated with Bordered Plant Bugs  
(Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae).**

**Kazutaka Takeshita, Yu Matsuura, Hideomi Itoh, Ronald Navarro, Tomoyuki Hori,  
Teruo Sone, Yoichi Kamagata, Peter Mergaert, Yoshitomo Kikuchi.**

***Microbes Environ.* 2015;30(4):321-329.**

### 講演タイトル

オオホシカメムシが解き明かすカメムシ類—*Burkholderia*共生系の進化

**Bordered plant bugs are a key taxon for elucidating the evolution of stinkbugs—*Burkholderia* symbiosis**

○竹下 和貴

(北海道大学／産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門)

多くの植食性カメムシ（カメムシ下目）は消化管後部に盲嚢と呼ばれる袋状組織を発達させ、その内腔中に共生細菌を保持している。多様なカメムシ類の網羅的調査により、カメムシ下目の5つの上科のうちヘリカメムシ上科とナガカメムシ上科の種が、Betaproteobacteria綱*Burkholderia*属の中でも“stinkbug-associated beneficial and environmental (SBE)”グループと呼ばれる特定系統の*Burkholderia*を毎世代環境中から選択的に獲得し共生させることが明らかとなってきた。このことから、カメムシ類—*Burkholderia*共生系の進化的起源はヘリカメムシ・ナガカメムシ上科の共通祖先にあると従来考えられてきた。しかし最近の共生細菌叢解析により、上記2つの上科と姉妹群の関係にあるホシカメムシ上科のオオホシカメムシ科も*Burkholderia*と共生関係にある可能性が示唆され、カメムシ類—*Burkholderia*共生系の起源については明確な回答が得られていない状態となっていた。そこで本研究では、オオホシカメムシ科の3種について、FISHにより共生細菌の消化管内局在を、クローン解析および次世代シーケンシングにより共生細菌叢を、そして診断PCRにより野外集団中の成虫および卵の共生細菌感染率を調査した。その結果、ヘリカメムシ・ナガカメムシ上科の種と同様、オオホシカメムシ科も*Burkholderia*を環境中から選択的に獲得し盲嚢特異的に共生させていることが判明した。その一方で、オオホシカメムシ科の*Burkholderia*共生細菌は、ヘリカメムシ・ナガカメムシ上科のSBEとは系統的に大きく異なり、根粒菌や植物成長促進根圏微生物を含む“plant-associated beneficial and environmental (PBE)”グループと呼ばれる系統であることが明らかとなった。これらの結果は、カメムシ類—*Burkholderia*の環境獲得型共生系の進化的起源がホシカメムシ・ヘリカメムシ・ナガカメムシ上科の共通祖先にあることを示唆している一方、共生細菌の系統特異性がカメムシ類の進化過程でSBEとPBE間で大きく遷移したことを示しており、この共生系が従来考えられていたよりも複雑な進化を遂げてきたことを強く示唆している。

## 招待講演 1



### **Flavin-based electron bifurcation, a novel mechanism of energy coupling in anaerobic microorganisms**

Rudolf Kurt Thauer

Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology (Germany)

Seven years ago we discovered that the cytoplasmic butyryl-CoA dehydrogenase-EtfAB complex from *Clostridium kluyveri* couples the exergonic reduction of crotonyl-CoA to butyryl-CoA with NADH and the endergonic reduction of ferredoxin with NADH via flavin-based electron bifurcation [1]. In the following years many other cytoplasmic enzyme complexes capable of energetic coupling via this novel mechanism were found in anaerobic microorganisms [2, 3]. The findings have revolutionized our understanding of the energy metabolism not only of Clostridia [4], but also of methanogenic archaea [5] and acetogenic bacteria [6]. A brief history of what recently was considered to be “the biggest breakthrough in bioenergetics of recent decades” [7] has been published [8].

[1] F. Li, J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel and R. K. Thauer, Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* 190, 843-850 (2008)

[2] W. Buckel and R. K. Thauer, Energy conservation via electron-bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 94-113 (2013).

[3] J.K. Demmer, H. Huang, S. Wang, U. Demmer†, R. K. Thauer and U. Ermler, Insights into flavin-based electron bifurcation via the NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP oxidoreductase structure. *J. Biol. Chem.* 290, 21985-21995 (2015).

[4] Y. Zheng, J. Kahnt, I. Kwon, R. Mackie and R. K. Thauer, Hydrogen formation and its regulation in *Ruminococcus albus*: Involvement of an electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase, of a non-electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase and of a putative H<sub>2</sub>-sensing [FeFe]-hydrogenase. *J. Bacteriol.* 196, 3840-3852 (2014).

[5] A.K. Kaster, J. Moll, K. Parey, and R. K. Thauer, Coupling of ferredoxin- and heterodisulfide reduction with H<sub>2</sub> via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2981-2986 (2011).

[6] J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran, S. Segovia, S. Nagaraju, M. Köpke, P. Dürre and R. K. Thauer, Energy conservation associated with ethanol formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation. *J. Bacteriol.* 197, 2965-2980 (2015).

[7] N. Lane, *The Vital Question: Energy, Evolution, and the Origin of Complex life*. W.W. Norton & Company, New York and London. page 150 (2016)

[8] R. Thauer, My lifelong passion for biochemistry and anaerobic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 1–30 (2015).

## 招待講演 2



### 茶色い宝石から紐解く腸内微生物生態系の真実

福田 真嗣

株式会社メタジェン / 慶應義塾大学先端生命科学研究所

「茶色い宝石」この言葉が生まれた背景には、長年の腸内細菌研究で培われた実験技術や知見、そして近年の技術革新による分析装置の高度化があったことに他ならない。

ヒトの腸内には数百種類以上でおよそ 100 兆個にもおよぶ腸内細菌が生息しており、これらの集団（腸内細菌叢あるいは腸内フローラと呼ぶ）は腸管細胞群と密接に相互作用することで、複雑な腸内微生物生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムはヒトの健康維持に重要であることが知られているが、そのバランスが崩れると大腸癌や炎症性腸疾患といった腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や代謝疾患といった全身性疾患につながることも知られている<sup>1,2</sup>。したがってその重要性から、腸内フローラは異種生物で構成されるわれわれの体内のもう一つの臓器とも捉えられるが、一方で個々の腸内細菌がどのように振る舞うことで腸内エコシステムの恒常性維持に寄与しているのか、すなわち宿主-腸内フローラ間相互作用の分子機構の詳細は不明な点が多い。

われわれはこれまでに、腸内フローラの遺伝子地図と代謝動態に着目したメタボロゲノミクスを基盤とする統合オミクス解析技術を構築し、腸内フローラから産生される短鎖脂肪酸である酢酸や酪酸が、それぞれ腸管上皮細胞のバリア機能を高めて腸管感染症を予防することや、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の分化を促すことで、大腸炎を抑制することを明らかにした<sup>3,4</sup>。他にも、便秘薬摂取による腸内環境改善が慢性腎臓病の悪化抑制に効果があることも明らかにした<sup>5</sup>。

このように腸内フローラ由来代謝物質が生体恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなったことから、本研究成果を社会実装する目的で、慶應義塾大学と東京工業大学とのジョイントベンチャーとして株式会社メタジェンを設立した<sup>6</sup>。本発表では、「腸内デザインによる病気ゼロ社会」をキーワードに、科学的根拠に基づく食習慣の改善、適切なサプリメント開発や創薬など、腸内エコシステムの人為的修飾による新たな健康維持、疾患予防・治療基盤技術の創出に向けたわれわれの取り組みについて紹介する。

References: (\*correspondence, †equal contribution)

1. Fukuda, S. and Ohno, H. Gut microbiome and metabolic diseases. **Semin. Immunopathol.** 36: 103-114, 2014.
2. †Aw, W. and †\*Fukuda, S. Toward the comprehensive understanding of the gut ecosystem via metabolomics-based integrated omics approach. **Semin. Immunopathol.** 37: 5-16, 2015.
3. Fukuda, S., *et al.*, Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature** 469: 543-547, 2011.
4. †Furusawa, Y., †Obata, Y., †\*Fukuda, S., *et al.*, Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature** 504: 446-450, 2013.
5. †Mishima, E., †Fukuda, S., *et al.*, Alteration of the intestinal environment by lubiprostone is associated with amelioration of adenine-induced CKD. **J. Am. Soc. Nephrol.** 26: 1787-1794, 2015.
6. <http://metagen.co.jp/>

## 男女共同参画・ダイバーシティ推進委員会 教育講演

### 「色覚の多様性とカラーユニバーサルデザイン CUD」

○岡部 正隆

(東京慈恵会医科大学解剖学講座 / NPO 法人カラーユニバーサルデザイン機構)

色は光の波長成分を元にして神経系で合成される感覚である。その感覚は遺伝的背景に依存した個人差が存在する。我々は身近なところで、色の違いによって重要な情報を判断している。学会においても、カラー印刷したポスターや、液晶プロジェクターを用いたカラフルなプレゼンテーション、学術雑誌におけるカラー図版が通常用いられており、その中で使用している色そのものに重要な情報が含まれていることが多い。文字や記号のような形の違いに基づいた情報伝達手段と異なり、色による情報伝達は色覚の個人差によって、相手に正確に伝わらない可能性がある。

日本人男性の5%、日本人女性の0.2%に存在する色弱という視覚特性では、色の見え方がその他の人たちと異なるために、学会のみならず教育現場や公共で情報弱者として不便を強いられていることがある。発表者らは、2001年より、様々な学会において、色弱の人たちにも理解しやすいカラー図版の作成方法や蛍光顕微鏡画像の供覧方法を普及させるために活動を始めた。この活動はすぐにマスコミなどで取り上げられ、当初「色覚バリアフリー」と称していた。その後この啓発活動は、より多くの人たちの協力のおかげで「カラーユニバーサルデザインCUD」として、自治体や公共交通機関、様々な企業の商品や活動に広がりを見せている。

本学会に参加されている方々は、多かれ少なかれ、講義や講演、書籍、ホームページ、ポスターなどの媒体を介して、自らが情報発信源として活躍する機会があると推察される。皆さんの発信した情報を読む人たちの色覚には多様性があることを忘れないで欲しい。本講演では、色の見え方とその多様性、少数派色覚の特徴や困難を踏まえて、より多くの人たちに情報を伝えるためのカラーユニバーサルデザイン CUD のノウハウを紹介する。皆さんの将来の活動に是非活用していただきたい。

#### CUDに関する参考サイト：

色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法

<https://www.nig.ac.jp/color/>

NPO 法人カラーユニバーサルデザイン機構

<http://www.cudo.jp>

## 大会事務局プレゼンツ 緊急パネルディスカッション

学会って必要か？微生物生態学会ってホントにいるけ？

司会：横須賀大会総合プロデューサー 高井 研

パネリスト：【学会バスターズ】 1号、2号、3号の皆さん（身に危険が及ぶ可能性があるため当日まで身元は明かせません）

【学会保守派】 南澤学会会長、鎌形編集委員長、若手1号、2号（ロッキーのように修行のため連絡がとれません）

大学・公的研究機関・民間の研究者や理系の大学生や大学院生は、研究活動と学会は切っても切り離せないものと特に疑問を感じることなく日々活動されていることでしょう。大辞林では、学会とは「同じ学問を専攻する学者が、研究上の協力・連絡・意見交換などのために組織する会」と説明されていますが、それなら研究会を開催すればいいじゃん！とツッコミを入れたいくなります。なぜ、年に1マソ円程度の学会費を納めてまで、学会員になり、そして数年に一回は、評議員やら、学会大会実行委員やら、学会誌の査読やら編集やら、いわゆる学会の雑用と呼ばれる「ご奉仕」に借りだされて、ヒィヒィ言ってるんでしょうか？

おそらくヒィヒィ言っている学会員は、ヒィヒィ言っていない学会員（つまりそれは学生や比較的若い世代の研究者だと思います）が何らかのメリットを受けているという大義名分のために、一生懸命身を粉にして、自分の時間や大切なサイエンスに没頭する時間を削ってまで働いているのです。特に、学会長や学会誌編集委員長、あるいは学会事務局や編集幹事の一生懸命な姿を想像するだけで頭が下がります。

しかし、そんな頭が下がる行為は本当に必要な事なんですか？いわゆる大多数の学会は、本当に学会という存在を必要としているのでしょうか？少なくとも我々、日本微生物生態学会は、その意義をもう一度、見つめ直す必要があるように思えます。

もし、皆さんが客観的に「日本微生物生態学会なんて特に必要ないよね？」と感じるなら、横須賀大会は日本微生物生態学"研究会"として、日本微生物生態学"学会"解散届を警視庁組織犯罪対策課に届けたい！と名言を吐くのなら、学会長や学会誌編集委員長、あるいは学会事務局や編集幹事達は、「まあもう少し頑張ってみるか。なあ、ばあさんや」と思うでしょう。

そんなパネルディスカッションを行います。学会員は全員集合。

## S1

### 地球化学会プレゼンツシンポジウム

#### "微生物はそえるだけ" (桜木花道)

日時：10月24日(月) 09:15～11:25

オーガナイザー：川口 慎介 (海洋研究開発機構)、高井 研 (海洋研究開発機構)

講演者：川幡 穂高 (東京大学大気海洋研究所)、北台 紀夫 (東京工業大学地球生命研究所) with 共同研究者たち、板井 啓明 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)、角皆 潤 (名古屋大学大学院環境学研究科) with 中川書子

それは昨年のことだった。2015年日本地球化学会年会在横浜国立大学で行われていた。ふとしたきっかけでその学会プログラムを見てみると、「あれ、なんかよく知っている微生物生態学研究者が(しかもJAMSTEC所属の研究者も)たくさん招待されているな」と気づいた。もっとびっくりしたことに、日本地球化学会のセッションオーガナイザーや口頭発表者は、ほぼすべて私がよく知っている研究者の名前に占められていたのだった。また私が学会プログラムをチェックしていたのも、2015年日本地球化学会年会の市民講演会に招待されていたからだった。日本地球化学会の恐るべき陰謀に気づいたのはその時だった。「知らぬ間に、日本微生物生態学会が、JAMSTECが、そして私自身が、日本地球化学会に飲み込まれようとしているんだ!」と。ヌノウラは「一体どういうことだよ!? ケバヤシ!」と叫んだ。便宜上ケバヤシになった私は力説した「ヤツらの狙いは...、古細菌アーキアだよ!!」、大会事務局一同「な、なんだってー!!」。かような茶番<sup>\*1</sup>を一通り終えてから私は提案した。「日本微生物生態学会が、"伝統と格式" とか言って胡座をかいている日本地球化学会を取り込んでしまえばいいんだよ!」。そう。このシンポジウムはそういうキッカケで企画されました。でもキッカケなんてどうでもいいよね。"伝統と格式" にこだわらない真の地球化学者をお取り寄せしました。微生物生態学と地球化学は本来とても親和性が高い学術分野。その健やかなるときも、病めるときも、喜びのときも、悲しみのときも、富めるときも、貧しいときも、これを愛し、これを敬い、これを慰め、これを助け、真心を尽くすことを誓いますか?

\*1 出典の wikipedia: [https://ja.wikipedia.org/wiki/MMR\\_マガジンミステリー調査班](https://ja.wikipedia.org/wiki/MMR_マガジンミステリー調査班)



## S1-1

## ホモ・サピエンスが創りだした新しい世界と環境

○川幡 穂高

東大・大気海洋研

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

ホモ・サピエンスの最初の先祖はエチオピアの大地に約20万年前の間氷期に誕生しました。約8-6万年前にアラビア半島にわたり、全世界に拡散しました。私達の研究によると急激に湿潤化したため、「対岸に美味しい食糧があるだろう!!」と期待したものと考えられます。現代人の胃に棲むピロリ菌のDNAの系統分析結果もこの時期を示唆しています。彼らの一部が日本に約3.8万年前にやって来ました。世界最古の土器は、日本の縄文土器（青森県の大平山元I遺跡）で1.65万年前のものでした。私達の研究によると、当時の夏の気温は現在より7℃も低く、根室の環境に相当します。濃霧で陸源食糧に恵まれず、海産物に頼り「海鮮鍋」を食べていたはずで、縄文土器に付着した有機物の精密分析の結果と整合的です。土器の発明は「殺菌」+「食糧確保」で革命的な生活環境の改善をもたらしました。日本の人口は、縄文初期に2万人、中期に27万人、晩期8万人でしたが、三内丸山遺跡もこのトレンドを反映し、温暖な中期に相当する5900-4200年前に栄えました。私達の研究によると、2.0度の急激な降温、緯度方向で300kmに相当する大きな変化が起こりました。陸の動植物の生態系は変化し、たぶん食糧難が原因で人々は散逸したと推定されます。日本の西日本の夏の気温を誤差0.3度で復元しました。最高最低の温度差は2.1度で、最高温度は平安時代初期の820ADでした。寒冷期は、日本社会の大きな変化期と一致していました：縄文社会/弥生社会、古墳/古代天皇公家社会、古代天皇公家/武家社会、武家/近代社会の境界に対応します。近年、人間の活動の影響で、地球環境問題が起こりました。自然が経験した速度のほぼ100-10万倍で変化しています。エコな社会が望まれています。ホモ・サピエンスは「賢い人間」という意味で、頭を使うことに特徴がありますが、多大なエネルギーを必要とします。そこで、人間はエコではありません。極言すると「エコ」は「アホ」に通じます。この能力は化学反応的には酸素呼吸の賜物ですが、酸素は体にとり劇薬です。熱力学的には1気圧で25度なら、私達の体は二酸化炭素と水が安定です。私の生きている間に、地球外の惑星で微生物の発見がなされると確信しますが、ホモ・サピエンスに相当する生物の存在は、この宇宙で非常に限られると考えられます。なぜなら宇宙はとても「静か」だからです。

## S1-2

### 電気化学でもたらす生命の起源

○北台 紀夫<sup>1</sup>, 山口 晃<sup>3</sup>, Yamei Li<sup>2</sup>, 山本 正浩<sup>4</sup>, 中村 龍平<sup>2</sup>, 高井 研<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東工大・地球生命研究所, <sup>2</sup>理化学研究所 環境資源科学研究センター 生体機能触媒研究チーム, <sup>3</sup>東京工業大学 物質理工学院, <sup>4</sup>海洋研究開発機構 深海・地殻内生物圏研究分野

E-mail: nkitadai@elsi.jp

『電気化学』, 『生命の起源』というキーワードを見て, 多くの人が第一に思い浮かべる研究は Miller と Urey が 1953 年に行った火花放電実験であろう (Miller, 1953). 彼らは原始大気にカミナリが落ちる想定で模擬実験を行い, 数種のアミノ酸が生成することを示した. この成果に対する反響は大きく, 今でも多くの生物学・化学系の教科書で生命起源の第一ステップとして紹介されている. しかし, 原始地球の表層環境についての理解は当時から大きく変化し, 実現可能性について疑問が持たれるようになった. また, そもそもアミノ酸が大気から海に大量に供給されたとして, そこから生命システムが如何にして生じてくるかは全く説明できない状況が続いていた. 近年, 深海熱水噴出孔の調査から, 噴出孔の内から外へ向かう定常的な電子の流れが発見された (Nakamura et al., 2010; Yamamoto et al., unpublished). この電気発生場は海水中の二酸化炭素を還元・固定し, 生体分子を生じていく原始的代謝システムを駆動した可能性がある. 本発表ではこの新たなシナリオを紹介し, 上述した 2 つの条件 (原始地球における実現可能性, 生命システムとの関連性) を満たしうるものであることを示す. 原始代謝の発生過程を検証するための室内実験についても紹介する.

## S1-3

## ヒ素と水銀の地球化学的研究史を編む

○板井 啓明

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

E-mail: hisotaro@gmail.com

科学にせよ芸術にせよ、それがロマンや感動に満ちたものであっても、日々発展させるには支援の手が必要である。「地球および宇宙における元素の分布および挙動の包括的理解」という純粋科学的な目的を掲げた地球化学も、国家的なビッグプロジェクトの副産物の恩恵を受けて進歩してきた。例えば、マンハッタン計画は放射性元素に対する人類の理解を劇的に深め、ルナ計画は高精度の質量分析の発展を促した (松久・赤木 2005; Wieser et al. 2005)。ビッグプロジェクトによる功罪両面の発生が不可避であることを受け入れるならば、自発的に副産物を拾い集めて体系知の肉付けに貢献する研究者が必要である。今回ヒ素と水銀という二つの元素を取り上げたのは、両者の化学的性質の類似性に着目したものではない。両者の共通点は、些か「嫌われ者」だったということである。1990年代以降、アジア各地で地下水汚染の原因となっていることが判明したヒ素と、1950年代以降に公害問題で注目され、今また越境汚染の懸念から規制に関わる条約締結にまで発展した水銀。これらは、マンハッタン計画のような巨大プロジェクトと比較できるものではないが、「環境問題」という 20 世紀後半における社会的問題提起が地球化学研究を加速させたという共通点を持つ。そのような背景で進んだ研究は、純粋科学的な視点で見れば、些かバイアスのかかった道筋を歩んだ可能性もある。しかし、両者の地球表層環境における挙動は、他の微量元素と比較して顕著に理解が進んでいるのも事実である。ある一面の理解が顕著に進むと、周辺領域との間に理解度のギャップが発生する。ヒ素と水銀の研究変遷を比較しながら辿ることで、ポテンシャルの発生から周辺領域への伝播の流れを良く見えるようにしてみようというのが本発表の試みである。科学の歴史において、理解のギャップを埋めて学問に厚みを与えてきたのは、(おそらくは) ビッグプロジェクトの動向とは離れた個別研究者の創意工夫である。仮に既存の「学会」という枠がそういった自主的営みの障壁として働いているとすれば、残念なことであるので、あえて微生物生態学会でこのような話をさせていただきたい。

## S1-4

### 木を見ず森を知る：微生物を斟酌せずに硝化速度や脱窒速度を測る

○角皆 潤, 中川 書子

名大・院・環境学

E-mail: urumu@nagoya-u.jp

O原子には三種の安定同位体 ( $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) が存在し、したがって  $\delta^{18}\text{O}$  および  $\delta^{17}\text{O}$  という二つの独立した安定同位体比が存在している。同じ分子の各同位体分子種 ( $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_3^-$ ,  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{17}\text{O}^-$ ,  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}^-$  など) が質量以外に差がなければ (=質量の違いのみに依存して同位体分別していれば)、 $\delta^{17}\text{O}$  値の変化に対する  $\delta^{18}\text{O}$  値の相対的な変化は、反応の種類や進行度合い、さらに関係する分子の種類に依らず、以下のような簡単な比例式で表される (Young et al., 2002; Matsuhisa et al., 1978)。

$$\delta^{17}\text{O} = 0.52 \times \delta^{18}\text{O} \quad (1)$$

陸水や海水、土壌、堆積物と言ったような一般的な地表環境中で、アンモニア等から硝化反応を経て生成する  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$ ) 中の O 原子は、式(1)で表される質量依存の関係が成立する  $\text{O}_2$  や  $\text{H}_2\text{O}$  に由来し、さらにそれが生成する過程で起きる同位体分別も一般的な質量依存同位体分別であるため、必ず式(1)が成立する。一方、大気中で  $\text{O}_3$  から O 原子を受け取って生成した  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_3^-_{\text{atm}}$ ) だけは式(1)が成立せず、式(1)が成立した場合に期待されるよりも有意に大きな  $\delta^{17}\text{O}$  値を示す (Michalski et al., 2003; Tsunogai et al., 2010)。

そこで以下の式(2)で定義される  $\Delta^{17}\text{O}$  を用いてその大小を定量化すると、 $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$  は 0‰、 $\text{NO}_3^-_{\text{atm}}$  は平均 +26‰ となり、 $\text{NO}_3^-_{\text{atm}}$  が沈着後に  $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$  と混合した場合は、その混合比に応じて  $\Delta^{17}\text{O}$  値は減少する。

$$\Delta^{17}\text{O} = \delta^{17}\text{O} - 0.52 \times \delta^{18}\text{O} \quad (2)$$

一方、何らかの一般化学反応 (=質量依存同位体分別) を受け、部分的に分解した場合は、 $\delta^{17}\text{O}$  や  $\delta^{18}\text{O}$  は変化してしまうが、 $\Delta^{17}\text{O}$  は変化しないで同じ値を保持する。従って、ある環境試料中に存在する  $\text{NO}_3^-$  の  $\Delta^{17}\text{O}$  を測定すると、その中に含まれる  $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$  と  $\text{NO}_3^-_{\text{atm}}$  の混合比を求めることが出来る。混合比は、その系に対する供給速度の比を反映するので、 $\text{NO}_3^-$  の  $\Delta^{17}\text{O}$  から、その系に対する  $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$  や  $\text{NO}_3^-_{\text{atm}}$  の供給速度や除去速度を定量化することが出来るようになる。 $\text{NO}_3^-_{\text{re}}$  の供給速度とは硝化速度であり、また除去速度とは、系に依っては脱窒速度を表すので、 $\text{NO}_3^-$  の  $\Delta^{17}\text{O}$  値を利用することで、培養に依らずに硝化や脱窒の定量化が可能になる。本講演では、その詳細と意義について、具体例をもとに紹介する。

## S2

### Microbial evolution to a changing environment

日時：10月24日(月) 09:15～11:25

オーガナイザー：石井 聡 (ミネソタ大学、USA)、丸山 史人 (京都大学)

講演者：Milko Jorquera (ラフロンテラ大学、Chili)、Michael Sadowsky (ミネソタ大学、USA)、Paulo Solomon (リオデジャネイロ連邦大学、Brazil)

微生物は多様な環境に柔軟に適応する、そして群集を形成し様々な宿主を含む環境と相互作用することで、環境を変化させることもできる。このような環境相互作用を通じて、微生物は迅速に適応進化するが、一方で、微生物を取り巻く環境も変化し続けている。変化し続ける環境の中で、如何にして微生物は環境に適応進化しているのかは非常に興味深い課題である。この課題と解き明かす鍵を得るには、多様な環境に生息する微生物に関する知見を得る必要がある。そこで、本シンポジウムでは、我々の日本とは全く異なる自然環境を対象にして多くの成果を挙げている研究者から講演頂く。すなわち、南米そしてアメリカで一線で成果を挙げている研究者から多様な環境に生息する微生物が変化し続ける環境でどう進化しているのかに関する知見を紹介して頂く。このセッションを通じて、日本の研究者には通常アクセスが難しい環境に生息する微生物適応進化の知見を直接得え、日本との比較を通じて、より普遍性の高い微生物の環境適応能力の限界を考察できたらと考えている。さらに、各講演者には、講演の最後に「各国の国内の研究動向、国際共同研究状況、特に国際共同研究費用の現状と、日本と一緒に取得することは可能なのか、人材交流などのニーズについて、外国人研究者がポジションを得ることができるのか」について各国の現状を話してもらおう。国際共同研究をしたいと思っている方は多いが機会がない、どうしたら良いかわからない若手研究者に「生きた」知識を提供したいと考えている。また、この点に関して、留学期間が長いパネリストを加えて、互いのサイエンスを高める相利的な国際的な共同研究体制を構築するにはどうしたらよいかを議論したい。

## S2-1

### Plant-growth promoting bacteria from extreme environments

○Milko Jorquera

Bioren, La Frontera Univ.

E-mail: milko.jorquera@ufrontera.cl

Chile is topographically and climatically diverse. A wide array of diverse undisturbed extreme environments are represented in the country, such that native plants are highly adapted to local conditions. We have explored the i) bacterial community structures, ii) bacterial alkaline phosphomonoesterases (APases), and iii) putative plant growth-promoting (PGP) bacteria in the rhizosphere of plants grown in representative Chilean extreme environments (Atacama Desert, Andes Mountain, Patagonia and Antarctica). Molecular approaches (DGGE, 454-pyrosequencing and qPCR) revealed the presence of Proteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria as the dominant phyla in the rhizosphere soils of native plants. The results also showed the occurrence of bacterial APase genes (*phoD* and *phoX*) in all studied soils. Differences in total and APase-harboring bacterial populations between extreme environments and between plant species were also observed. In general, the significant lowest bacterial diversities, APase gene abundances, and APase activities were observed in soils from Atacama Desert. The APase gene abundances were positively correlated among them and with APase activity of soils, but negatively correlated with phosphorus (P) availability in rhizosphere soils. Finally, some culture isolates showed PGP traits (organic P hydrolyzing, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity and production of auxin) and their inoculation stimulated the growth of wheat plantlets under differing growth conditions, soil type and water shortage. Further studies are needed to determine which environmental factors regulate the structures of rhizobacterial communities, and how (or if) specific bacterial groups may contribute to the growth and survival of native plants in each extreme environment. Our studies also evidence possible applications of bacteria from extreme environments to improve wheat growth in soils under water shortage conditions by adverse climate events.



## S2-2

# Soil Microbial Response to Environmental Stresses - does being indigenous help?

○Michael Sadowsky

University of Minnesota

E-mail: sadowsky@umn.edu

Rhizobia have been used for a long time to improve plant growth and information on medicinal use of legumes was recorded by Hippocrates in 4th century B.C. the Romans knew of the benefits of soil movement to improve crops. Rhizobia were first isolated in the 1800's and the Nitragin Company was founded in 1898 after a Milwaukee entrepreneur purchased rights to a commercial process for the production of nitrogen-fixing rhizobia. Despite the use of rhizobial inoculants for more than 200 years, we know very little about their ecophysiology in natural soils. This broad genetic and physiological diversity of the rhizobia makes generalization difficult and does not allow for a "Unified General Theory" concerning their ecology. Moreover, our lack of understanding is due to the heterogeneity of rhizobia and soils, changing environmental conditions, and false assumptions from lab studies. It has always been assumed that the competitiveness of strains infecting legumes is dependent upon environmental conditions, and presuming that they are indigenous, they are likely more fit to interact with host plants than more recent bacterial additions to soils. However, there is no easy definition of indigenous and bacterial survival is influenced by a variety of stress factors. To address these questions, we started out by looking at what it means to be indigenous. Here we report the on the extra long-term saprophytic survival of rhizobia and show that we still know little about being indigenous.

## S2-3

### Microalgal blooms in a changing ocean

○ Paulo Solomon

Federal University of Rio de Janeiro

Microalgae, i.e. oxygen-evolving photosynthetic protists, are ubiquitous in aquatic environments. Together with cyanobacteria, these microorganisms respond for most of the primary production in the oceans. In coastal waters, microalgae form massive blooms that can be harmful both to humans and to marine life. Contamination of shellfish with phycotoxins that rend them unsafe for human consumption and massive fish kills are among the unwanted, direct effects of algal blooms in coastal areas. Human-driven changes in marine ecosystems, especially eutrophication and climate-induced changes that result in increased temperature and alterations in precipitation patterns are increasing the frequency and intensity of algal blooms in coastal environments worldwide. Moreover, a shift in microalgae community composition from autotrophic towards mixotrophic species, mainly flagellated forms, is expected to occur in this changing environment. Blooming microalgae interact in many ways with other components of the aquatic microbiota. During massive blooms, exudates from microalgal cells fuel bacterial secondary production. The rich microenvironment created during algal blooms is known to promote the growth of pathogenic bacteria such as vibrios. Associations of bacteria with algal cells can provide refuge from predation, conferring these bacteria competitive advantage to proliferate during algal blooms. On the other hand, several bacteria have been shown to elicit pathogenic effects against marine microalgae, acting as an important loss factor for algal populations and a potential mechanism of bloom control. Likewise, microalgae can display allelopathic effects on bacteria. Such diversity of interactions among microalgae and bacteria can be species-specific and are influenced by environmental factors. Thus, detailed studies are needed to elucidate algal bloom dynamics and their associate microbial communities for particular marine environments.



### S3

#### 群集生態学の最新アプローチであぶり出す微生物間ネットワークの真実

#### Elucidation of extremely complex microbial networks via updated synecological technologies

日時：10月24日(月) 12:40~14:50

オーガナイザー：中川 聡 (京都大学)、加藤 広海 (東北大学)

講演者：東樹 宏和 (京都大学)、加藤 広海 (東北大学)、山道 真人 (京都大学)、阿部 真人 (国立情報学研究所)

シーケンス技術の革新により、以前とは比べものにならないほど簡便かつ大規模に微生物群集の全体像を俯瞰できるようになってきた。しかし、それは同時に膨大なデータの氾濫と、未消化のまま世に送り出される論文の量産を招いたともいえる。進化を続けるシーケンス技術は我々を魅惑してやまないが、大規模データの解析方法やそれを支える理論的研究に正面から取り組む微生物学者は少ない。某国に倣ってデータの規模を競うのではなく、データをしゃぶり尽くしつつも、そこに通底する原理・法則をスマートにあぶり出してみたい。このような本国の微生物生態学者が直面している切実な問題に対して、それを好機と見て熱視線を送る研究者達が、実はいる。マクロな生態系を対象としてきた群集生態学者である。彼らから見れば、微生物群集はさまざまな生態学的理論を検証し、また解析技術を構築するための絶好のモデル系である。本企画では、微生物を群集生態学の諸問題を解決する糸口ととらえる野心的な新進気鋭の若手研究者4名に、1. 植物と菌根菌の複雑なネットワーク解析、2. 実験的な土壌微生物叢の再構築と超長期培養の解析事例、3. 補食-被食ネットワークにおける進化の役割、さらに4. 時系列データが産む因果ネットワーク解析の新たな可能性、についてご講演いただく。これらの話題から導出される理論や解析技術は、我々が微生物群集に対峙する際に大きな助けになると考えられ、幅広い生物間ネットワークを紐解く強力な武器となるであろう。時代の寵児へのぼりつめようとしている群集生態学者を交え、微生物生態学と群集生態学が共創し醸成しうる我が国独自の研究展開について学会員と議論したい。

## S3-1

## 群集生態学であぶり出す共生微生物間の大規模ネットワーク

○東樹 宏和

京都大・人環

次世代シーケンサーの登場によって、微生物叢 (microbiome) の構造を記載しやすくなったとは言え、共生微生物で構成される相互作用系の動態を理解するのは極めて困難な課題である。1 個体の植物体内であっても、数百・数千種の細菌や真菌が共生しており、その 1 種 1 種のゲノム構成や遺伝子発現パターンをたとえ詳細に解明できたとしても、共生系全体レベルの現象理解との間には大きなギャップが存在する。植物体内では、無数の共生微生物種の間で複雑な相互作用のネットワークが構成されていると考えられ、その動態を理解すること自体が複雑系科学の課題として極めて挑戦的である。

発表者は、次世代シーケンシングによって得られた微生物叢データをネットワーク科学と群集生態学の枠組みで解析することにより、無数の微生物種とその宿主生物で構成される複雑な共生ネットワークの全体像を解明してきた (*Nature Communications* 5:5273; *Science Advances* 1:e1500291)。現在、この手法を応用し、宿主体内における共生微生物どうしの相互作用ネットワークを大規模に解明する研究を進めている。植物根内の共生真菌叢を対象として行った最近の研究では、一見複雑な根内微生物叢が少数の離散的な型 (rhizotype) に分類されることを発見した (*Journal of the Royal Society Interface* 13:20151097)。この離散的な型の形成においては、宿主体内における共生者間の連携や競争が影響力を持っていると考えられるため、その潜在的な種間関係の全体像をネットワーク構造に還元して考察した。その結果、宿主体内での関係性において、明確なネットワーク・モジュール構造が明らかとなっただけでなく、それぞれのモジュールにおいて中核的な役割を担っていると予想される種の存在が浮き彫りとなってきた。

宿主が植物であれ動物であれ、次世代シーケンシングを用いた解析では大量の共生微生物が検出されるのが一般である。その無数の微生物の中から、微生物叢全体の動態を制御している可能性のあるものを事前情報なしに抜き出すこの研究アプローチは、基礎・応用両面での重要性を今後増していくと予想される。ヒト腸内細菌叢データへの適用事例も紹介しながら、今後の方向性について論じたい。

## S3-2

## 再構築された土壌微生物群集の超長期培養

○加藤 広海<sup>1</sup>, 渡来 直生<sup>2</sup>, 森 宙史<sup>2</sup>, 大坪 嘉行<sup>1</sup>, 永田 裕二<sup>1</sup>, 黒川 顕<sup>2,3</sup>, 津田 雅孝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大・院生命, <sup>2</sup>東工大・院生命理工, <sup>3</sup>国立遺伝研

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

細菌叢は地球上の様々な環境に形成されているが、土壌環境の細菌叢は、莫大な構成種によって形成されている点で興味深い。この細菌多様性は農業生産や環境浄化等の土壌機能の根幹を成していると考えられているが、この複雑な菌叢構造がどのような原理によって形成されるのかはほとんどわかっていない。そこで我々は、近年腸内細菌叢の分野で目覚ましい成果を上げているノトバイオロジー技術を土壌環境に応用することで、細菌叢が新規土壌環境でどのように多様性を増加させながら複雑化していくのか、時間と共にどのようなレベルで安定もしくは変遷していくのかを調べることにした。本研究では特に、土壌から抽出した細菌叢を滅菌した元の土壌に移植する、いわゆる「戻し」移植を実施し、次世代シーケンサーによる 16S rRNA gene amplicon sequencing で経時的に菌叢を行なうことで、元の菌叢を再現できるのか、並列サンプルの菌叢形成プロセスに再現性はあるのかを明らかにした。暗所 25°C の一定条件で培養した結果、移植された細菌叢は数週間で最大菌密度  $10^9$  16S rRNA gene copies/g soil に達し、その後 2 年間は栄養添加なしで菌密度を維持した。菌叢解析の結果、菌叢サイズが増加する初期数週間は *Firmicutes* や *Proteobacteria* が優占するものの、徐々に *Acidobacteria* 等の由来土壌で優占していたグループの割合が回復し、移植後半年から 1 年目には genus レベルで由来土壌の菌叢構造に概ね戻る傾向を、またその後 2 年目まで安定する傾向を示した。一方で、97% OTU 組成は実験期間内で安定せず、また菌叢における割合が戻った多くの genus において初期とは異なる OTU によって構成種が置き換わっていく傾向が見られた。これらの結果は異なる分類階層において、菌叢の復元性（レジリエンス）と構成種の置換性という異なる性質が現れていると考えられた。さらにこれら菌叢の遷移プロセスは、並列サンプル間で極めて高い再現性を示したことから、安定条件下における土壌細菌叢形成は予想以上に determinative（決定的）な現象であることがわかってきた。

## S3-3

## 群集の理解における進化の役割

○山道 真人

京都大・白眉／生態研

近年、適応的な進化（遺伝子頻度の変化）が短期間で起きること、またそのような「迅速な進化」（rapid evolution）が個体数の変動や群集構造、生態系機能に大きな影響を与えうることが明らかになってきた。特に微生物は世代時間が短く、集団サイズが大きいことから、薬剤耐性の獲得といった適応進化が短期間で起こりやすい。そのため、微生物生態学において、迅速な進化は群集構造の理解に重要な役割を占めると考えられる。

本発表ではまず、プランクトン・真菌・細菌などを対象に調べられてきた迅速な進化と群集動態との間の相互作用、すなわち「生態—進化フィードバック」（eco-evolutionary feedbacks）についての先行研究を紹介する。ここでは、進化と種間相互作用が個体数変動のパターンをどのように変えるか、という点に注目して、適応進化が絶滅を防ぐ「進化的救助」（evolutionary rescue: Bell & Gonzalez 2009 *Ecol. Lett.*）や、公共財を介した個体数と遺伝子頻度の振動（Sanchez & Gore 2013 *PLoS Biol.*）、防御形質の進化によって捕食者—被食者系の個体数振動の位相差が周期の25%から50%（逆位相）に変化する「逆位相振動」（antiphase cycles: Yoshida et al. 2003 *Nature*）、また被食者の個体数が一定であるにもかかわらず捕食者の個体数が振動する「隠れた振動」（cryptic cycles: Yoshida et al. 2007 *PLoS Biol.*）といった代表的な動態の例に触れる。その際、微生物群集の培養実験と数理モデルという2つのアプローチを組み合わせる有効性を強調したい。

次に、群集と進化の間のフィードバックを今後さらに深く理解していくために必要な研究の方向性として、多種が相互作用するネットワーク・適応のメカニズム・時空間的な不均一性・適応的でない進化などのテーマを提案する。最後に、微生物群集とその他の群集の違い、長期的な進化が群集にもたらす影響、進化生物学と群集生態学のアナロジーについても議論したい。

## S3-4

# 時系列データを用いた因果ネットワーク推定法の最前線

○阿部 真人

国立情報研・JST ERATO

E-mail: masatoabee@gmail.com

生態系は、多数の種が競争/被食捕食/相利共生といった相互作用をすることによって、各種の個体数が時間的に変動する系である。それに対し、非線形力学系の数理モデルを構築し解析することで生態系の理論研究は発展してきた。一方、計測技術の発達によって大規模な個体数の時系列データが得られつつあるが、解析手法が発展途上であるため、実証研究に基づいた系の理解・予測・制御は十分に行われているとは言えない。最近、非線形力学系と埋め込みの定理に基づいた非線形時系列解析の手法が発展し、複数時系列間の因果関係と相互作用強度の推定が可能になった。これにより、個体数のダイナミクスを駆動する相互作用を時系列データから推定することができ、生態系の因果構造（因果ネットワーク）を明らかにすることができる。本講演では、個体数のダイナミクスを記述する力学系の基本から、非線形時系列解析の原理と応用例を紹介し、微生物の群集動態をどのように解析すればよいか議論する。

#### S4

ウイルスの存在意義を論じてみませんか？

**Would you like to discuss the raison d'être for viruses?**

日時：10月24日(月) 12:40～14:50

オーガナイザー：長崎 慶三 (高知大学)、緒方 博之 (京都大学)

講演者：長崎 慶三 (高知大学)、緒方 博之 (京都大学)、浦山 俊一 (海洋研究開発機構)、吉田 天士 (京都大学)、吉澤 晋 (東京大学)

およそ生命の営みある場所にウイルスあり。一般的なイメージとして、ウイルスと宿主は敵対関係にあると捉えられがちであるが、実際はそうばかりでもない。感染→発症→死滅といった激しい現象も確かに存在するが、様々な環境下において、ウイルスと宿主の平和的な共存はごく普通に果たされているようである。では何か？ウイルスの存在理由は何なのか？ウイルスはいかなる機能を持ち、いかなる役割を果たしているのか？宿主がウイルスとの共存を許容し続けるのはなぜか？進化の歴史は、なぜ両者の共存を認めてきたのか？昨今の分子解析技術の飛躍的發展により、その謎を解くためのアプローチが、まさに今、始まろうとしている。本シンポジウムでは、主に水圏環境下におけるウイルス-宿主間の多様な関係性を俯瞰し、ウイルスの存在意義について自由な討論を試みたい。様々な分野の皆様から（特に若い方々から）素敵なインスピレーションがもたらされるような、そんなシンポジウムになればと思う。



## S4-1

# 水圏ウイルスハンティング今昔：細胞死が狩りの合図だった時代

○長崎 慶三

高知大・黒潮圏

E-mail: nagasaki@kochi-u.ac.jp

一般的に、ウイルスと宿主は敵対関係にあると捉えられがちである。演者が藻類ウイルス研究を始めたときもそうだった。赤潮がウイルスの攻撃により消滅するという現象をより厳密に証明すべく、赤潮の原因となるプランクトンを死滅させるウイルスを探した。何とかしてそのウイルス（正確にはウイルスとその宿主）を手に入れ、実験室内で飼うことを望んだ。試行錯誤の末にそれは叶い、様々な感染試験を実施することによっていくつかのウイルスの性状を明らかにすることができた。言うまでもなく溶藻性のウイルスを生け捕るには宿主培養が必要である。その宿主藻体の死滅を引き起こすウイルスサイズの粒子を探索し、捕獲すること。まさにこの「細胞死を指標とした狩り」からウイルス研究はスタートしたものだ。世界各地でそうした努力が積み重ねられた結果、現在ではかなりの数のウイルス-宿主系が実験室内で飼育されるようになった。藻類宿主の範囲は緑藻・プラシノ藻・円石藻・珪藻・渦鞭毛藻・ラフィド藻など多岐に亘り、この事実は、あらゆる生物がウイルスの攻撃を受けるであろうという仮説を支持しているように見える。だが近年、新たな技術の開発により状況は大きく転じつつある。Urayama et al.(2015)は、潮溜まりに生えた天然の珪藻細胞群の中に少なくとも20種類を超えるRNAウイルスが「宿主にこれといった異常を呈さないままに」共存しているということを知った。すなわちここに来て、水圏中のウイルス対宿主の関係性は、当初想定されていたよりかなり「寛容」であるという可能性が示唆された。「感染→発症→死滅」といった激しい現象も確かに存在する。が、様々な環境下においてウイルスと宿主の平和的な共存がごく普通に果たされている可能性が、NGS技術等の目覚ましい発展に伴い徐々に明らかになりつつあるのである。では何か？ウイルスの存在理由は何なのか？ウイルスはいかなる機能を持ち、いかなる役割を果たしているのか？宿主がウイルスとの共存を許容し続けるのはなぜか？進化の歴史は、なぜ両者の共存を認めてきたのか？こうした謎を解くためのアプローチが今まさに始まろうとしている。様々な分野の専門家あるいは若手の方々の熱烈な参画を強く期待する。

## S4-2

### アメーバウイルス研究がもたらしたインパクト

○緒方 博之

京都大・化研

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

ウイルスはその発見当初から生命と物質の境界にあった。19世紀後半、タバコモザイク病の研究から、「微生物はろ過装置で除去できる」との当時の微生物の定義に適合しない病原体が単離され、「ウイルス（毒液）」の呼称が定着した。分子生物学の黎明期、ウイルス研究は遺伝暗号の解明に寄与し、ゲノム時代にはサンガーらにより最初の完全ゲノム決定の標的となった（1977年、 $\phi$  X174、5375塩基）。しかし、小型のウイルスはリボソーム程度の大きさであり、ウイルス＝「非生命」の見方は広く定着し、ゲノム熱狂時代も1996年の最初の真正細菌ゲノム決定まで到来しなかった。

近年、こうしたウイルス研究に変化がみられる。ウイルスが生命科学の直接の対象となり、ウイルスの生態系・生命進化における位置づけを議論できるようになってきた。こうした変化の要因の一つがアメーバ感染性のミミウイルスの発見である（2003年）。ミミウイルスは粒子径が $0.75 \mu\text{m}$ 、光学顕微鏡で観察でき、粒子には100種類以上のタンパクが含まれ、全長118万塩基対のゲノムには遺伝子を1000個以上コードし、その半数以上は機能予測不能である。その複雑さと未知数はマイコプラズマなどの最小生命を凌駕し、第4のドメインを形成するとも言われている。アメーバウイルスの研究はその後も重要な発見をもたらした。ウイルスに感染するヴァイロファージ、スターゲートと呼ばれる特殊なDNA放出システム、2016年にはラウルトラにより、ミミウイルスがヴァイロファージに対する獲得免疫システムを保有するとの提案もなされた。同時に、多様な巨大ウイルスが次々と発見されている。

我々は、転写系・複製修復系遺伝子に着目しミミウイルスなど巨大ウイルスの進化を追求してきた。ミミウイルスの系統は「第4のドメイン」との呼称に相応しく細胞性生物のドメインの起源までさかのぼると推定され、現存のゲノム多様性は原核生物の多様性を上回るとの認識に至っている。ウイルスはこれでも、生命と物質の境界にあるのか？ウイルスを直接の対象とする研究から何が分かるのか？T4ファージやHIV研究からは得られない新たな生物学が開けるのか？講演では、我々が行ってきた研究も含めて、巨大ウイルスの世界を概観し、ネオウイルス学創生へ向けて議論を喚起したい。



## S4-3

### 宿主を殺さず共存するウイルスを網羅する時代へ

○浦山 俊一

海洋研究開発機構

我々が認知できる変化は非常に限られており、病気のような明確な“兆候”が観察されない場合でも、ウイルスはありとあらゆる生物に存在し、その生命の状態に様々な影響を及ぼしているようだ。ウイルスの単離が主たる研究手段であった1990年代まで、多くのウイルス探索は宿主生物が示す病徴を指標として行われてきた。そのため、必然的に高い病原性を示す感染症ウイルスが主要な研究対象となり、ウイルス＝病原体という認識が形成されてきた。しかし近年、この状況は分子解析技術の発展により変わりつつある。例えば植物や真菌、昆虫などから非病原性または低病原性ウイルスが、また、無病徴の野生動物からMARSなどのヒト病原ウイルスが検出されている。中には宿主生物の生存に有利に働くと考えられるウイルスまで報告された。これらの事実は、我々の手元にある病原ウイルスを主としたウイルスリストが、実は発見が容易な“目立つウイルス”に偏ったものであることを示唆している。地球最大の生命圏として多様な生物を育む海洋でも、養殖において問題となる感染症ウイルスや微生物を殺すウイルスが主要な研究対象とされてきた。近年の単離に依らないウイルスメタゲノム解析においても、細胞外を浮遊しているウイルス、つまり細胞を破って出てきた病原ウイルスが解析対象となっており、非顕在性の“目立たないウイルス”はほとんど着目されてこなかった。そこで、病徴に依存しないウイルス探索手法を確立して浜辺の珪藻コロニー1つを調査したところ、20種以上の新規RNAウイルス全長ゲノムが検出された。その他にも様々な“普通の”海洋生物から多数のウイルスが検出されており、海洋においてもウイルスはありふれた遺伝因子として生物の中に共存している可能性を示している。本発表では、「これら“目立つウイルス”と“目立たないウイルス”がどの程度存在するのか？」その概要を明らかにすることを目指した研究内容も紹介し、宿主を殺さず共存するウイルスの存在と広がりを目を向けてみたい。

## S4-4

## ウイルスと微生物の競合的共進化

○吉田 天士

京都大・院農

E-mail: yoshiten@kais.kyoto-u.ac.jp

細菌感染性ウイルス(「ファージ」とも言うが、「ウイルス」に統一する方向で議論が進んでおり、ここではウイルスと呼ぶ)の発見から 100 年となる。かつて分子生物学の中心であった細菌ウイルスが、海洋に大量に見いだされ再び注目されている。海洋ウイルスは細菌に対して数の比で 15 倍、その総数は 1030 粒子に達する。毎日、20% -40% の海洋細菌が、感染溶菌されていると見積もられ、ウイルスは細菌から溶存有機物への流れを変え、地球規模の物質循環過程に大きく寄与している。これに加えて、ウイルスは次の大きく 3 つの様式で細菌の多様性にも大きく影響を及ぼす。1) 感染と同時に宿主のゲノムに入り込み、宿主のゲノム複製と同調して増殖するウイルスは溶原ウイルスと呼ばれる。溶原ウイルスは遺伝子ベクターとして、宿主の遺伝子型を変える。2) 環境に適応し偶発的にある微生物群集の環境密度が高まることがある。しかし、密度の高まりによりウイルス感染頻度も増し、結果的にその宿主微生物群集の密度は減少する(頻度依存的選択)。3) 細菌は制限酵素や CRISPR といった多様なウイルス防御獲得機構を獲得してきた。これに対しウイルス側では、防御を回避して感染するものが現れる。こうした両者間での軍拡競争ともいえるべき共進化過程により、微生物-ウイルスの遺伝的多様化が促されてきた。ウイルス感染しばしば個体の死を引き起こす。しかし、生物種レベルで見れば、ウイルスは特定の微生物個体群による長期的な環境占有を妨げ、微生物多様性を維持する効果をもたらす。また環境で増えたウイルス-微生物感染系では、共進化が促され、宿主に新たな遺伝子型が生じるチャンスを増やす。我々は、ウイルスによる微生物多様化と多様性維持が並行的に生じているとの仮説を検証すべくプロジェクトを進めている。仮説の検証はまだ道半ばであるが、これまでに海洋に優占するウイルスの完全長ゲノムを数多く構築することに成功した。さらにウイルスの遺伝子は、共存する宿主微生物の中で活発に転写されていた。メタゲノムに現れるウイルス配列は、別の場所から漂ってきたウイルスに由来するのではなく、共存する微生物-ウイルス間の相互作用が頻繁に起こっていることを明確に示している。講演では、このような本プロジェクトの現状を交えつつ、ウイルスが存在することの本質的な意義について議論したい。

## S4-5

## ウイルスによるロドプシン遺伝子の水平伝播

○吉澤 晋

東大・大海研

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

海洋表層の光エネルギーの利用は従来シアノバクテリアに代表される酸素発生型の光合成生物に限定されて考えられてきた。しかしながら、この常識は2000年以降の相次ぐ発見により大きく揺らぎつつある。2000年に海水をターゲットとしたメタゲノム解析から、微生物型ロドプシンが海洋細菌の間に広く分布することが明らかになり (Beja et al. 2000) プロテオロドプシン (以下、PR) と命名された。PRはオプシントランスポーターに発色団のレチナールが結合した光受容タンパクで、光を受容すると細胞内からプロトンを排出して膜電位を形成し、そのエネルギーでATP合成をする。言わば、“光駆動型プロトンポンプ”である。その後の研究から、海洋表層に生息する細菌の数十% (多い海域で約80%) がこの遺伝子を保持すること、真正細菌・古細菌・真核生物の3ドメイン全てから見つかることが明らかになってきた。またロドプシン遺伝子の分子系統解析から、16S rRNAとPR系統関係の不一致が様々な分類群で報告されており (Frigaard et al. 2006)、ロドプシン遺伝子がPhylum間やDomainを超えるような遺伝子の水平伝播を通して多様化してきたと考えられている。一方、「Proteorhodopsin genes in giant viruses」 (Yutin and Koonin) というタイトルの論文が2012年に発表され、海洋由来Giant Virusの中にPR遺伝子を持つものが存在すること、海洋細菌を対象としたメタゲノムデータから当該遺伝子が多数見つかることが報告され、VirusによるPR遺伝子の水平伝播の可能性が示唆された。しかしながら、Giant virusの持つPR遺伝子がどの生物由来なのかは依然よく分かっていない。また、Giant virusの持つロドプシンは“プロテオロドプシン”と呼ばれてはいるが、プロトンを輸送するために必須のアミノ酸部位が保存されていないことから、光でプロトンを輸送するのか？それとも他の機能を持っているのか？などの基礎的な事柄も分かっていない。本発表では、現在利用可能なVirusメタゲノムデータにどの程度ロドプシン遺伝子が存在するのか？またVirusが持つロドプシンの機能は何なのか？に注目し、海洋微生物間におけるVirusを介したロドプシン遺伝子の水平伝播の可能性を議論したい。

S5

日本細菌学会共催シンポジウム

寄生と病原性から紐解く微生物進化のパラダイム

**Parasitism and pathogenesis: paradigms in microbe evolution**

日時：10月25日(火) 10:10~12:20

オーガナイザー：菊池 義智 (産業技術総合研究所)、山口 博之 (北海道大学)

共催：日本細菌学会

講演者：林田 京子 (北海道大学)、武村 政春 (東京理科大学)、永井 宏樹 (大阪大学)、山岡 吉生 (大分大学 / ベイラー医科大学)

1859年、ダーウィンが「種の起源」で提唱したように、生命の存続を脅かすような環境因子の存在は、生物進化の方向性を決定づけ、その生物が多様化する大きな原動力となってきた。生物間の闘ぎ合いもそのような因子の一つであり、その包括的な理解は、生物多様性進化の絡繰りを探る上で極めて有益である。多くの寄生・病原性微生物は、宿主の免疫系をくぐり抜け、その体内に適応するために高度に特殊化した感染メカニズムを発達させている。それ故、それら寄生・病原性微生物は、“生物間相互作用（微生物と宿主の闘ぎ合い）を通じた生物進化”の絡繰りを紐解くための洗練されたモデルともいえる。そこで本企画では、1. タイレリア原虫の卓越した宿主細胞への寄生様式、2. 光学顕微鏡でも可視化できるアメーバの天敵巨大DNAウイルスの発見とその進化、3. レジオネラの感染細胞内における卓越した適応メカニズム、さらに4. ヘリコバクターとヒトとの共進化、といった微生物が魅せる4つの異なる生物間相互作用のお話を提供する。これらの話題を通して、微生物に見られる生物間相互作用の多彩なパラダイムを理解し、自由生活性から寄生、そして病原性への変貌を促す要因とそのメカニズムに迫る。さらにこれら微小生態系パラダイムから見えてくる生物多様性進化の絡繰りについても考えてみたい。本シンポジウムは、本学会と日本細菌学会との共同企画である。

## S5-1

# 全ゲノム解析から見えてくるマダニ媒介性タイレリア原虫の動物血球細胞への卓越した寄生様式

○林田 京子<sup>1</sup>, 横山 直明<sup>2</sup>, 杉本 千尋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大・人獣センター, <sup>2</sup>帯畜大・原虫研

E-mail: kyouko-h@czc.hokudai.ac.jp

タイレリア原虫は宿主動物・媒介節足動物と共に進化していく歴史の中で、多彩な生物学的特性を獲得してきた。あるものは動物内に穏やかに共生し、またあるものは動物に重篤な疾病をもたらしつつ、効率的に自己増殖を行う能力を獲得した。特に病原性タイレリアのもたらす宿主細胞の無限増殖、すなわち癌化という現象は巧みな自己増殖のための寄生戦略であり、生物学的にも珍しい特性で興味深い。このような原虫の寄生・共生・病原性の違いはどこから生まれるのか？我々はこの問いに答えるべく、本原虫の病原性をもたらす分子機序を理解することに加えて、大規模ゲノム解析からのアプローチで研究を進めてきたので、その知見を微生物の多彩な寄生進化の例としてここで紹介したい。

悪性タイレリアによる癌化には宿主細胞のNF- $\kappa$ B経路の活性化や、MDM2の異常発現といった癌化シグナル伝達経路の関与があることが、我々を含む過去の一連の研究により示されてきた。しかし宿主細胞癌化の原因となる原虫分子と、その分子機構の全容は未だ明らかではない。これには、宿主と共存する道を選んだ良性タイレリアのゲノム情報が有力な手がかりとなると考えた。そこで、良性タイレリアの全ゲノム解析及びデータベースの整備に着手し、さらに感染実験系の構築により各発育期原虫の遺伝子発現解析も行った。今まで未知であったベクターステージにおける原虫遺伝子発現や、良性タイレリアが白血球よりも赤血球を棲み家として独自に進化してきた分子機構の一端が見えてきた。また、悪性タイレリアとの比較ゲノム解析からタイレリアゲノムのダイナミックかつ戦略的な構造変化が明らかとなった。特に、癌化機構に関与していると疑っている遺伝子群が悪性タイレリアにおいて遺伝子重複を起こしていたことは興味深い知見であった。

また、悪性タイレリアのアフリカ各国における野外分離株9株を全ゲノム解読した。精度の高い分子系統解析によって、本原虫種が過去にマダニ内で株間の遺伝子交雑を起こした痕跡を見出し、本原虫の起源が地理的にアフリカの限られた地域であったとする仮説を提唱した。悪性タイレリアのアフリカにおける大流行には、本来生物がなす穏やかな病原体-宿主の進化の過程に、人為的な家畜の普及というイベントが不運にも関与しているのかもしれない。今後はこれら得られた知見を、診断・治療・予防薬の開発、及び制圧戦略の立案に役立てていきたい。



## S5-2

## アメーバに感染する巨大DNAウイルスから生命進化を読み解く

○武村 政春<sup>1,2</sup>, 三上 達也<sup>2</sup>, 室野 晋吾<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京理科大・理, <sup>2</sup>東京理科大・院科学教育

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

【背景・目的】2001年、大型DNAウイルスが細胞核の起源に関わったとする仮説が、TakemuraとBellにより発表された。2003年、アメーバに感染する巨大ウイルス（GV）APMVが発見され、それが細胞核と形態的類似性を持つウイルス工場を細胞質に形成することが明らかになると、この仮説は注目され始めた。やがてForterreらにより細胞核の起源とウイルス工場との関係に言及がなされるようになり、真核生物進化とGVとの関係が本格的に議論されるようになった。そこで我々は、GVと真核生物の進化的関係の解明を目的として、（1）B型DNA polymerase (pol) を用いた分子系統学的解析と（2）真核生物進化とのより緊密な接点を持つ新規GVの単離を目指した研究を行ってきた。

【成果1】4種類（ $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\zeta$ ）の真核生物polのGV polとの近縁度は $\delta$ が最も高く、 $\zeta$ 、 $\alpha$ 、 $\varepsilon$ の順に低くなることがわかった。GVの仲間であるPoxviridaeのpolは、 $\alpha$ 、 $\varepsilon$ と近縁度が高い傾向にあることもわかり、真核生物polは $\varepsilon \rightarrow \alpha \rightarrow \zeta \rightarrow \delta$ の順に徐々に獲得されてきたことが示唆された。これらと近縁なpolをGVが持っている理由が、遺伝子水平移動によって真核生物から得たからか、GVが獲得したものが真核生物へと移動したからかは不明だが、GVの感染、増殖機構の解明が、GVと真核生物の進化的関係の解明に重要であることは示唆された。

【成果2】現在までに数種類の新規GVを単離した。荒川から単離したTokyovirusのゲノム解析により、これがMarseilleviridaeに属すること、欧州や豪州、アフリカから単離されたMarseilleviridaeとは異なる系統を持つことが明らかとなった。一方日本の淡水、海水から単離したOrigamivirusのゲノム解析により、これがMimiviridae subgroup Aに属することが明らかとなった。subgroup Aでは、欧州で単離されたAPMV、ブラジルで単離されたSambavirus、そしてOrigamivirusのゲノムが極めてよく似ていることから、subgroup Aの世界規模の地域的差異はほとんど存在しないと考えられた。このことは、subgroup Aの進化速度が極めて遅いか、地位的差異を帳消しにするウイルス粒子の大規模循環系の存在を意味していると考えている。

【展望】今後は、アメーバ以外の真核微生物を宿主とするGV研究も重要になってくるだろう。未知のGV単離の試みは、未知の微生物・ウイルス相互作用にメスを入れ、生命進化に対するGVの関わりの謎に満ちた部分を洗い出すことになるに違いない。

## S5-3

## レジオネラの分泌装置とエフェクターから紐解く感染細胞内での卓越した宿主細胞最適化機構

○永井 宏樹

阪大・微研

E-mail: hnagai@biken.osaka-u.ac.jp

レジオネラ (*Legionella pneumophila*) は、自然界の淡水・土壌環境中どこにでもいるありふれた細菌です。しかしながら、レジオネラに汚染された水滴(エアロゾルといいます)をヒトが吸入すると、肺の中で増殖し、治療をしなければ死に至るような重篤な肺炎を引き起こすことがあります(レジオネラ症)。レジオネラは自然界において自由生活性アメーバを自然宿主として、その中で増殖します。アカントアメーバ(*Acanthamoeba*)を始めする自由生活性アメーバもまた、自然界中どこにでもいるありふれた微生物です。レジオネラはこのような自由生活性アメーバとの相互作用の歴史の中で、アメーバ中で生存・増殖するためのメカニズムを獲得したと考えられます。レジオネラは研究室内で培養でき、遺伝子操作も容易です。20世紀の終わりまでに、病原性に必須なレジオネラ遺伝子の遺伝学的探索の結果、20-30のdotあるいはicmと名付けられた遺伝子群が同定されました。当初これらがなにをコードしているかは必ずしも明らかではなかったのですが、2000年に解明されたR64などのプラスミドの接合伝達系遺伝子群に近縁であることが判ってきました。現在では、プラスミド接合伝達系と起源をともにする生体高分子輸送系のことを総称してIV型分泌系(T4SS; the Type IV secretion system)と呼びます。さらにT4SSは、アグロバクテリウムのものに近縁な古典的なもの(IVA型分泌系; T4ASS)と、レジオネラのDot/Icm分泌系に近縁なもの(IVB型分泌系; T4BSS)に大別されます。驚くべきことに、レジオネラは宿主の如何によらず、Dot/Icm T4BSSを使って宿主真核細胞中に生存・増殖可能なニッチを構築します。レジオネラ目細菌群は、レジオネラ以外に人畜共通感染症Q熱の起因菌であるコクシエラや、植物害虫として知られているアブラムシの共生菌リケッチエラなどを含み、これらは全て細胞内寄生性の生活環を持ちます。系統解析の結果は、これらレジオネラ目細菌群の共通祖先がDot/Icm T4BSSを染色体上へ取り込み、以後垂直伝搬で維持されていることを示しています。現在、IV型分泌の研究は、構造生物学的知見がドライビングフォースとなり、急速に進展しつつあります私たちも、レジオネラのDot/Icm IVB型分泌系、およびそれに近縁なR64プラスミド接合伝達系に着目し、構造・機能解析を進めています。今回は、これまでに得られた成果を含めて議論したいと思います。

## S5-4

# ヘリコバクター・ピロリのヒトとの共進化から紐解く共生から病原性へのパラダイムシフト

○山岡 吉生<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大分大・医, <sup>2</sup>Dept. Med. Gastro, Baylor Coll. Med.

E-mail: yyamaoka@oita-u.ac.jp

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）がヒトの胃粘膜に炎症を引き起こし、消化性潰瘍の発症に深く関与すること、さらに胃癌の大部分がピロリ菌感染を基盤に発生することは、明らかである。しかし感染者のほとんどが胃癌にならずに一生を終え、また胃癌の発症率にかなりの地域差があるのも事実である。さらに、欧米の一部の国やアフリカ諸国ではピロリ菌感染率が高いにもかかわらず、胃癌の発症率は、東アジア諸国に比べかなり低い。さらに同じ東アジア内でも、南方にいくほど胃癌の発症率は低くなる。これらの理由を説明できる因子として、ピロリ菌の病原性の多様性が注目を浴びている。ピロリ菌は6万年以上前からヒトと共進化を行い、世界各国において異なる遺伝子型を形成し病原性も多様化してきた。ピロリ菌の遺伝子はヒトのそれに比べ突然変異率が高いので、特に短期間（数千年～数万年）における詳細な変化を知ることができる。複数遺伝子の塩基配列からピロリ菌を分類する手法：MLST（Multilocus Sequence Typing）や次世代シーケンサーによる全ゲノム解析により、徐々にピロリ菌とヒトの共進化の詳細が明らかとなり、単にピロリ菌がヒトとともに、アフリカを起源として、世界中をどのように移動してきたか、という人類学的な見地が明らかになってきたのみならず、移動の中で獲得した病原性についても明らかになりつつある。今回は、ピロリ菌とヒトとの共進化から紐解ける様々な事項について概説する。



S6

日本原生生物学会共催シンポジウム

原生生物の環境センシングと運動

**Protist Motility : sensing and responding to environmental signals**

日時：10月25日(火) 10:10~12:20

オーガナイザー：野田 悟子 (山梨大学)、矢吹 彬憲 (海洋研究開発機構)、島野 智之 (法政大学)

共催：日本原生生物学会

講演者：上田 昌宏 (大阪大学 / 理化学研究所)、稲葉 一男 (筑波大学)、園部 誠司 (兵庫県立大学)、中垣 俊之 (北海道大学)、洲崎 敏伸 (神戸大学)

微生物は外部環境における化学物質の濃度変化等の刺激を感知し、運動方向の変化などの細胞応答を行う。このような外部環境のセンシングやそれに伴う細胞応答は、生態学的にもバイオレメディエーション等の応用面においても重要な意味を持つ。刺激のセンシングや方向性のある走性応答は、不均一な環境中でランダムに運動するよりも栄養の確保や宿主への侵入という面で有利に働くと考えられる。細菌が持つ運動器官である鞭毛については、これまでに鞭毛形成に必要な遺伝子群や鞭毛装置の構造、鞭毛モーターの回転により細胞が遊泳する詳細な仕組みが明らかにされており、刺激に応答して鞭毛モーターの回転方向を変える走化性シグナル伝達経路は二成分制御系の例として教科書にも掲載されている。一方、真核生物の鞭毛構造や運動メカニズムは細菌とは異なり、鞭毛を使わない運動様式である滑走運動やアメーバ運動等の細菌細胞にはみられない多様な動きをする。このようなユニークな細胞運動は、様々な原生生物において観察されるが、運動機構とその制御機構には不明な点も多い。また、原生生物は栄養源までの最適経路の探索や、生息空間を記憶するという環境適応能力を持っていることも報告されている。本シンポジウムでは、あらゆる生物に普遍的に観察される形質である「細胞運動」をキーワードとして、原生生物の複雑でダイナミックな運動機構や環境をセンシングして細胞応答を行う仕組み、それを応用した水環境のモニタリング装置の開発等について話題を提供していただく。

**ポスター発表**：10月24日(日)にポスター会場にて、シンポジウム紹介のポスターを掲示します。

## S6-1

### 細胞性粘菌の濃度勾配センシングと走化性運動

○上田 昌宏<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科, <sup>2</sup>理化学研究所生命システム研究センター QBiC

E-mail: masahiroueda@fbs.osaka-u.ac.jp

細胞の走化性応答は様々な生物で重要な役割を持っており、例えば、免疫系において感染や炎症が起こった際に白血球が集まってくる応答も走化性の例の一つである。真核生物の走化性の分子メカニズムは、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* でもっともよく理解されている。粘菌細胞は野外ではバクテリアを食べて生きているが、周りに餌がなくなると自ら cAMP を細胞外に分泌し、その濃度勾配に応答して互いに集まって多細胞体を形成する。その際、粘菌細胞はわずか数%程度の緩やかな濃度勾配を 10 万倍にも及ぶ広い濃度域にわたって走化性応答を示すことができる。誘引物質の濃度勾配センシングは GPCR 型受容体とそれに共役した三量体 G タンパク質が担っているが、このような広範な濃度域にわたるセンシングのメカニズムはわかっていない。最近、我々は三量体 G タンパク質の制御因子として Gip1 (G protein interacting protein 1) を同定し、Gip1 が走化性の応答濃度レンジを拡張していることを見出した。gip1 遺伝子の破壊株は、低濃度域では濃度勾配を認識できるが、高濃度域においてはその機能を失っており、走化性に異常を示した。また、Gip1 は G タンパク質と結合し、G タンパク質の一部を細胞質に留めていた。誘引物質刺激により受容体が活性化すると、G タンパク質は細胞質から細胞膜へと移行し、それによって濃度勾配に沿った細胞膜上での G タンパク質の再配置がおこった。これらの知見から、Gip1 は G タンパク質の細胞質—細胞膜間シャトルリング (shuttling) を制御することで、走化性シグナル伝達に必要な G タンパク質の細胞膜上での再配置や利用可能な量を調節していることが明らかとなった。このようなメカニズムによって真核生物の走化性でみられる広いダイナミックレンジでの濃度勾配認識が起こる。数理モデルによる濃度勾配センシングのメカニズムの理解も進んでおり、合わせて発表する予定である。

Kamimura, Y., Miyanaga, Y. and Ueda, M. (2016). "Heterotrimeric G protein shuttling via Gip1 extends the dynamic range of eukaryotic chemotaxis.", PNAS 113: 4356-4361.

## S6-2

# 多機能運動装置ハプトネマが示す新規微小管系屈曲運動のメカニズム

○稲葉 一男

筑波大・下田臨海

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

ハプト藻は主に海洋に生息する微細藻類であり、海洋生態系においては珪藻とともに一次生産者として重要な役割を果たしている。しかし、真核生物全体におけるハプト藻の系統的位置は、未だにはっきりとは分かっていない。ハプト藻は、遊泳のための2本の鞭毛以外に、「ハプトネマ」と呼ばれる微小管系の運動装置をもつことで特徴づけられる。ハプトネマは、基質への付着と滑走運動、餌の付着、凝集、取り込み、機械刺激の受容と逃避反応など、実に多彩な機能をもつことが知られている。構造的には6-7本のシングレット微小管を小胞が囲む構造をとっており、その運動は鞭毛・繊毛と大きく異なる。ハプトネマの長さは種によって異なるが、我々が研究対象としている *Chrysochromulina* 属では長いものでは細胞の10倍にまで達するハプトネマを有する。ハプトネマが機械刺激を受けると、数ミリ秒以内という高速でコイル状に縮む「コイリング」が見られる。この現象はカルシウム依存的に起こることがわかっているが、微小管には分子モーター様の構造は見られず、微小管がいかに変化してコイリングが起こるのか、その機構はいまだ謎に包まれている。また、ハプト藻類がなぜハプトネマを獲得し進化してきたのか、明確な答えは得られていない。最近の研究で、酸性化の進行により *Chrysochromulina* 属の増殖が阻害的な影響を受けることが明らかになっており、ハプトネマの生理機能やコイリングメカニズムの解明は、広く海洋生態系の解明に寄与すると我々は考えている。本講演では、ハプト藻を特徴づけるハプトネマの高速コイリングのメカニズムを明らかにする目的で、我々が *Chrysochromulina* sp. を用いて明らかにしたいいくつかの研究成果を紹介したい。まず、微小管脱重合阻害剤であるタキソールの存在下で弱い周期的な屈曲が形成されること、カルシウム依存的な高速コイリングが阻害されることを見出した。これは、コイリングに微小管のダイナミクスが関与していることを示している。さらに、電子顕微鏡による観察の結果、6-7本の微小管のらせん型配置と、微小管どうしをつなぎとめる繊維状構造を明らかにした。ハプトネマのプロテオミクス解析の結果も含め、現在までに得られている知見からハプトネマのコイリングメカニズムを考察したい。

## S6-3

### ケイソウの滑走運動機構

○園部 誠司, 山岡 望海

兵庫県立大・院生命理学

E-mail: sonobe@sci.u-hyogo.ac.jp

ケイソウは不等毛植物に含まれる藻類で、珪酸質の被殻に覆われている。羽状目ケイソウの多くは活発な滑走運動を行い、その速度は $2-30 \mu\text{m}/\text{秒}$ である。被殻には縦溝と呼ばれるスリットがあり、ここから粘液物質が分泌されこれを足場として運動しており、粘液物質は細胞内のアクトミオシンで駆動されていると考えられているが、粘液物質とアクチンの存在は確認されているものの、その他については不明である。ケイソウミオシンを同定するために単細胞性のメガネケイソウ (*Pleurosigma* sp.) からミオシンの抽出を行った。殻をガラスビーズで分割し、 $3 \text{ M NaCl}$ で抽出したところ、ATP感受性の  $130 \text{ kDa}$  アクチン結合タンパク質が見出された。部分アミノ酸配列を決定したところ、全ゲノム配列が決定されている *Phaeodactylum tricornutum* のミオシンと高い相同性があった。また、モノクローナル抗体で蛍光抗体染色したところ、アクチンに沿った染色が見られた。これらのことから  $130 \text{ kDa}$  アクチン結合タンパク質がケイソウミオシンであることが強く示唆された。イカダケイソウは群体性の羽状目ケイソウで、細胞が一層に積み重なった形態を持つ。群体内の細胞は隣接する細胞との間で活発な滑走運動を行う。電子顕微鏡で観察すると細胞間には粘液物質様のものが観察され、これによって細胞同士が接着していることがわかった。また、細胞内には2本1組になったアクチン繊維束が細胞の上下に存在しており、アクチンおよびミオシン阻害剤で運動が阻害されることから、運動の原動力発生にはアクトミオシン系が関与していると考えられた。細胞を懸濁して群体を解離させ、ポリスチレンビーズを添加したところビーズが縦溝に沿って往復運動するのが見られた。また、蛍光-concanavalin Aで染色したところ、縦溝に沿った帯状の染色が見られ、これが細胞の滑走に従って伸縮するのが見られた。一方、メガネケイソウでは滑走中に succiny-wheat germ agglutinin 結合物質が断続的に分泌されているのが見られたが、必ずしも滑走運動とは同期しておらず他の粘液物質が滑走運動に関わっていることが示唆された。これらの結果から、ケイソウの滑走運動は縦溝から分泌された粘液物質が細胞内のアクトミオシンで駆動されて起こっていると考えられた。

## S6-4

### テトラヒメナにおける空間形状への適応的遊泳

○中垣 俊之

北大・電子研

E-mail: nakagaki@es.hokudai.ac.jp

1935年、ブラムシュテッドは、ゾウリムシの空間形状記憶について興味深い報告をした。ゾウリムシは、三角や四角形の狭小空間をしばらく遊泳した後に広い空間に出ると、経験した狭小空間形状に添った遊泳をするというものである。その後、いくつかの異なるグループが類似の実験を試みたが、否定的な結論もあれば、肯定的な結論もあった。観察結果の素朴な事例報告が多く、決着はついていないように思われる。今回我々は、この積年の検討に決着を付けるべく、ゾウリムシをテトラヒメナに変え、空間形状を球形に限定して、改めて追試した。ただし、球形空間の大きさを段階的に変え、十分な実験繰り返し数を確保して、統計的な検定を実施した。結論は、肯定的であった。広い空間に出たとき、およそ半数のテトラヒメナが円形軌道を描き、その直径は経験した狭小空間の直径に正比例した。一方、残りの半数程度のテトラヒメナは、経験した狭小空間の影響がはっきりと認められず、直線的な遊泳を示した。個体による差が、非常に大きく、今後検討すべき興味深い課題である。このような空間適応的遊泳が、どのようなしくみでもたらされるかについて単純化した模型（遊泳の運動方程式）を構成して、検討した。繊毛虫の行動は、百年前から繰り返し報告されているように、多彩である。それらは、繊毛打制御、すなわち膜電位動態へと帰着できる可能性がある。その意味において、繊毛虫の物理行動学なる方向性が期待できる。本発表は、國田樹博士（実験パートのリーダー）、手老篤史博士（模型パートのリーダー）らとの共著論文（I. Kunita, T. Yamaguchi, A. Tero, M. Akiyama, S. Kuroda, T. Nakagaki, A ciliate memorizes the geometry of a swimming arena, *J. R. Soc. Interface* (2016) Vol.13, 20160155; DOI: 10.1098/rsif.2016.0155）に基づいている。



## S6-5

## タイヨウチュウはどのように仲間とエサを見分けているのか？

○洲崎 敏伸

神戸大・院理

E-mail: suzaki@kobe-u.ac.jp

真核生物における自己・非自己の認識機構の進化的な原点は原生生物にある。すなわち、ほとんどの原生生物は、同種の原生生物を攻撃したり共食いしたりすることはないし、エサを正しく認識して捕食している。たとえばアメーバ *Amoeba proteus* は同種のアメーバをエサとして共食いすることは絶対にない。これには、アメーバが分泌して細胞表面に付着する小型ペプチドが自己認識の標識分子として利用されていると考えられている。この仕組みは動物細胞のMHC分子を用いた自己・非自己の認識機構と類似している。また、太陽虫の一種 *Actinophrys sol* はエサの認識に  $\beta$ -1,3グルカン結合タンパク質 ( $\beta$  GBP) を利用している。このタンパク質は、細長く伸びる軸足という細胞質突起の中に存在する分泌性の小胞の中にふだんは格納されている。エサの候補である何らかの物体が軸足の表面に接触すると、軸足はその物質を軸足の表面に付着させたままで急速に短縮するとともに、 $\beta$  GBPを細胞外に放出する。エサの表面にグルカン分子が存在した場合には、グルカン分子に $\beta$  GBPが結合し、その結果形成されたグルカン・ $\beta$  GBP複合体は、タイヨウチュウの細胞表面での仮足の形成を誘導し、最終的にエンドサイトーシスがひきおこされて捕食行動が完了する。このような $\beta$  GBPを介したエサの認識機構は、多細胞生物で広く知られているパターン認識受容体を用いた病原菌などの異物の認識機構と極めて類似しており、自然免疫応答の進化的起源であると考えられる。太陽虫類の軸足は、エサの接触以外にも、多様な刺激に敏感に反応してその長さを変化させる。たとえば、様々な種類の水溶性毒物に対しても、太陽虫は軸足を短縮させる反応を示す。太陽虫類の一種である *Raphidiophrys contractilis* は、普段は水底の一か所に定着してほとんど動かない。しかし、毒物を検知すると、体から伸びている多数の軸足を急速に縮め、丸くなる。その結果、水底への付着性がなくなり、水流に乗って流れ去る。その結果、有害な水環境から逃避できると考えられる。*R. contractilis*の各種毒性物質に対する反応性は、魚類（メダカ）や甲殻類（アルテミア）などと比較して100～10,000倍鋭敏であり特に水銀などの重金属イオンに対して高い感度を示した。毒物を検知するのに必要な時間も約20分と短く、持ち運びできるほどの超小型（重量5kg）の水質モニタリング装置を作ることができたので紹介する。

## 第31回大会 若手交流会

日時：10月22日(土) 18:00～19:00

会場：第1会場（大ホール）

オーガナイザー：若手会（代表：稲葉知大 産業技術総合研究所）

若手会では今年も若手研究者・学生を対象にした交流会を開催予定です。どうやって学会を自分の糧にするのか？そのために若手会はどうあるべきか？そんなことを語り合う参加型企画を考案中です。交流会終了後には、場所を移しての懇親会も予定しており、交流会企画と共に鋭意準備中です。

詳細は微生物 HP の若手の会ページでも公開予定です。そちらも合わせてご覧ください。

また若手会では今年度企画への皆様からのご意見・ご要望を募集しております。

若手会へのご連絡は以下のメールアドレスへお願いいたします。

jsme.wakatekoryu@gmail.com

## 教育研究部会

昨年度の活動報告および今年度の活動計画について

日時：10月23日(日) 12:10～13:00

会場：第2会場（展示室）

## 微生物電気化学研究部会

微生物電気化学研究部会セミナー2016

日時：10月24日(月) 11:40～12:30

問い合わせ：electromicrobiology.jsme@gmail.com

代表：石井 俊一（海洋研究開発機構）

講演者：Shawn McGlynn（東京工業大学）

近年、微生物燃料電池における発電菌に代表されるように、電気化学的な活性をもつ微生物が注目を集めています。また、自然環境中の微生物間に電気化学的相互作用があることが示され、微生物生態学においてもホットトピックになっています。しかし海外と比べると、日本国内において微生物電気化学に関する研究が広範囲に行われているとは言い難く、該当分野のさらなる普及が望まれます。

本研究部会は、微生物電気化学に関連する知識や技術の共有化・普及を図るとともに、共同研究などの機会を創出することを目的とします。

本年の学会大会では、部会の立ち上げに伴い、部会の発足趣旨説明を行うと共に、菌体間の直接電子輸送を介した共生関係について、東工大のShawn McGlynn博士に講演して頂きます。興味のある方は、是非ご参集下さい。

会場の規模の関係から、参加希望者はメールにて上記問い合わせ先へ連絡下さい。

オープンなランチョンセミナー形式のため、部会への入会が必須ではありませんが、学会大会期間中の開催となるため、学会への参加登録が必要になります。なお、事前参加申し込みのあった方のうち、先着20名程度に弁当を配布する予定です。

講演

「菌体間直接電子移動による嫌気メタン酸化菌とバクテリアの共生メカニズム ～生体エネルギー学的帰結～」

**"Direct interspecies electron transfer as a mechanism of syntrophic coupling between ANME archaea and partner bacteria: current hypotheses and bioenergetic consequences."**

講演者：Shawn McGlynn (東京工業大学)

The biochemistry underlying the oxidation of methane by ANME archaea in anoxic environments has remained a mystery for some time. Recent genomic and physiological evidence suggests that part of the key lies in two distinct mechanisms which may facilitate direct interspecies electron transfer (DIET) between ANME and partner sulfate reducing bacteria. One mechanism is based on the nanowire concept, and another is thought to rely only on cytochrome proteins. In this presentation, I will discuss the evidence for these proposals, and the bioenergetic consequences of oxidizing methane through DIET.



# 一般ポスター発表 要 旨

## P-001

## 土壌単離細菌による高濃度ディーゼルモデル化合物の生分解

○竹下 俊英, カナリー ロバート

横浜市大・国総学部・生命環境

E-mail: i140392a@yokohama-cu.ac.jp

何種類もの化学物質により構成される石油成分は、燃料や化学製品等の多様な場面で人々の生活に関わっている。この石油という混合物は、その多くの割合を脂肪族や芳香族炭化水素が占めているために水と混合すると石油成分と水とで二層に分画される。同時にその難水溶性から微生物による生分解が起こりにくく、また高濃度の場合は細胞毒性や酵素の不活性化が懸念される。このような物質を効率よく代謝することが可能な微生物は、バイオレメディエーションや疎水性化学製品に関連するバイオプロダクション等において有用であることが考えられる。本研究では、土壌から単離されたグラム陰性細菌のKK6株における非水溶性炭化水素の生分解能について調査を行った。この株は、*n*-hexadecane (水溶性0.1 ppb以下)を単一炭素源として生育可能であり、1,000 mg/Lの*n*-hexadecaneを96時間でほぼ全て生分解することが可能である。41種類の脂肪族、芳香族炭化水素で構成したディーゼルモデル化合物50,000 mg/L (5% w/v)にこの株を添加したところ、微生物の生育と脂肪族炭化水素の生分解を確認することができた。この環境で培養35日目の微生物含有試料と非含有試料の抽出物をガスクロマトグラフィーで解析を行い比較したところ、炭素数12から24と広い範囲での*n*-alkaneが最大で35% KK6株に生分解を受けていたことが示唆された。更なる調査では、アスファルテンの誘導体として設定した非水溶性物質の1-dodecyl naphthaleneを1000 mg/L含む培地においてKK6株の生育が確認された。この抽出物をLC/ESI-MS/MSを用いて解析を行ったところ、5-(1-naphthyl)pentanoicや6-(1-naphthyl)hexanoic等の様々な長さの直鎖アルキル基を持つナフテン酸が見受けられ、KK6株が脂肪性側鎖の酸化により生分解を行っていることが示唆された。16S rRNA遺伝子解析の結果、KK6株は*Psudomonas aeruginosa*と大変近い種であることがわかった。同時に、KK6株のアルカンヒドロキシラーゼ(*alkB*)をコードする遺伝子配列の解析では、この遺伝子が既知の*P. aeruginosa*の*alkB*遺伝子と近い関係にあることが示唆された。

## P-002

## 有機硫黄汚染物質の生分解及びLC/ESI(-)-MS/MSを用いた二硫化物等の代謝産物の評価

○小澤 昂平, 根元 裕規, 菊池 愛美, カナリー ロバート

横浜市大・国総学部・生命環境

E-mail: i130153c@yokohama-cu.ac.jp

Benzothiazole(以下BTH)は窒素と硫黄、Benzothiophene(以下BT)は硫黄を構造中に含む多環芳香族炭化水素(PAH)である。BTHはゴムの製造工程で加硫促進剤や酸化防止剤として世界中で使用されており、BTは石油やクレオソートの構成要素の一種として知られている。BTHとBTは地表水や土壌中に放出される環境汚染物質であるため、生分解を含むこれらの環境運命を解明することは非常に重要である。そこで本研究ではLC/ESI(-)-MS/MSを用いた*Sphingobium barthaii*によるBTHとBTのバイオトランスフォーメーションにより生成する代謝産物の同定及び代謝経路の作成を研究目的とした。*S. barthaii*はグラム陰性土壌細菌で、先行研究によりPAHを分解することが知られている。*S. barthaii*と共に培養した後に抽出した試料をフルスキャンモードで解析した結果、BTHとBTの両方で分子量が広範囲にわたる多数の化合物が検出され、最大のものは364 Daであった。これらの化合物はコントロールでは検出されなかったため微生物による代謝産物であると考えられる。検出した代謝産物をプロダクトイオンスキャンした結果、BTHとBTの両方で芳香環の酸化と開裂が起こり代謝経路下流の単環化合物だけでなく、バイオトランスフォーメーション後の非生物的反応により高分子二硫化物が生成したことが示された。二硫化物はBTHとBTの五員環が酸化されることにより生成したと考えられる。7つの二硫化物と単環化合物を含む代謝経路下流の生成物を検出し、それらの構造を推定することでBTHとBTの代謝経路を拡張することができた。Dibenzothiopheneでは生分解による二硫化物の生成が報告されてきたが、BTHとBTでは今まで報告されていない。本研究でのバイオレメディエーションによる二硫化物の代謝産物の発見は、BTHやBTの環境運命を予見することに貢献し、環境浄化につながることを期待される。

## P-003

**高温度条件が *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* 群集構造に与える影響**

○道中 敦子, 重村 浩之, 山下 洋正

国総研・下水道部

E-mail: michinaka-a92ta@nilim.go.jp

開発途上国では、先進国に導入されている排水技術を適用するには経済的負担が大きいことから、低コストで排出COD基準値を満たす処理方法が主に開発・導入されているが、一方で、熱帯地域に位置する途上国において都市化が進む地域では富栄養化が問題視され、放流先の水質基準にリンや窒素の栄養塩に関する基準を導入することについて検討されている。このことから、途上国においても今後の発展に伴い下水中の栄養塩除去を視野に入れなければならない。先進国で広く導入されている生物学的リン除去（EBPR）は、ポリリン酸蓄積細菌（PAOs）の代謝機構を利用した下水中からリンを除去する下水処理法である。これまでの知見より、PAOs は20℃以下の低温を好むことが知られており、熱帯地域へ生物学的な下水高度処理技術の導入を考えた場合、高水温条件（25～35℃）が系内微生物群集に与える影響を調べることは不可欠である。しかしながら、高水温条件でのリン除去活性や微生物群集の生態学的情報はほとんどない。そこで本研究では、主要なリン蓄積細菌であると報告されている *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'*（以下、*Accumulibacter*）に着目し、実験室規模EBPRリアクター（容積2Lの連続回分式リアクター）を用いて、高水温条件が群集構造に与える影響を調べた。22℃、25℃、28℃、30℃の温度条件にてそれぞれ70日間以上の運転を行ない、polyphosphate kinase (ppk1) 遺伝子を対象とした定量PCRにより、*Accumulibacter* の各 clade (I, IIA, IIB, IIC, IID, IIF) についてその挙動を調べた結果、22℃、25℃運転時では群集構造はほとんど変化しなかったが、28℃運転下において Clade I, IIA, IIB が減少し、Clade IID, IIC は維持されていた。Clade IIF は28℃運転条件下で増加傾向が確認された。30℃運転条件下では、いずれも減少したが、その中でも Clade IIA と IIB は著しく減少し、30℃運転開始約30日後には検出限界以下となった。以上のことから、*Accumulibacter* のグループによって温度に対する感受性が異なることが示唆され、比較的高温条件である28℃において、適応可能なものが存在することが明らかとなった。

## P-004

# 付加体の地下圏微生物によるメタン生成プロセスと分散型エネルギー生産システムの創成

丸林 創<sup>1</sup>, 荻 祐太郎<sup>2</sup>, 石川 修伍<sup>2</sup>, 松下 慎<sup>2</sup>, ○木村 浩之<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>静岡県・危機管理部, <sup>2</sup>静岡大・理, <sup>3</sup>静岡大・グリーン研

西南日本の太平洋側の地域は、深さ 10 km を超える厚い堆積層（付加体）によってできている。付加体は、海洋プレートが大陸プレートの下に沈み込む際、海底堆積物が大陸プレートに付加してできた地質構造である。付加体の堆積層は、海底堆積物に由来することから有機物を多く含んでいる。また、付加体の深部帯水層には嫌気性地下水が蓄えられており、そこには大量の付随ガス（主にメタン）が含まれている。本研究では、静岡県中西部の付加体（四万十帯の三倉層群；古第三紀に付加した地層）に位置する川根温泉の掘削井（深度 1,148 m）を調査した。川根温泉の掘削井は、平成 6 年から現在まで継続して毎時 43 立方メートルの地下温水（温泉）と毎時 30 立方メートルの付随ガスを湧出している。現場では、地下温水の水温、pH、酸化還元電位、電気伝導率を測定した。その結果、深部帯水層は 50-60℃ と比較的高温であること、嫌気状態にあることが判明した。また、付随ガスの分析を行った結果、80% 以上の割合でメタンが含まれていた。次に、地下温水に含まれる微生物群集を対象としたメタ 16S rRNA 遺伝子解析を試みた。その結果、有機物を分解して水素ガスと二酸化炭素を生成する水素発生型発酵細菌が優占していた。また、水素ガスと二酸化炭素からメタンを生成する水素資化性メタン生成菌も数多く検出された。さらに、地下温水に有機基質を添加した微生物群集の嫌気培養も試みた。その結果、地下温水に含まれる水素発生型発酵細菌が有機基質を分解して水素ガスと二酸化炭素を生成し、その後、水素資化性メタン生成菌が水素ガスと二酸化炭素からメタンを生成する代謝過程を観察することができた。一連の研究結果より、川根温泉の付随ガスに含まれるメタンは、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、堆積層中の有機物から生成されることが示された。さらに、地下温水を用いた嫌気培養では短時間でメタンが生成されたことから、付加体の深部帯水層の微生物群集は高い活性を有し、現在においても活発にメタンを生成していることが示唆された。本発表では、島田市（静岡）が進める“川根温泉メタンガス利活用事業”についても紹介する。そして、付加体の地下圏微生物と付随ガスを利活用した分散型エネルギー生産システムについて解説するとともに、その将来展望について考察する。



## P-005

## クーラントおよび廃油含有廃水からのメタンの回収

○山田 知加<sup>1</sup>, 加来 伸夫<sup>1</sup>, 菅原 弘紀<sup>2</sup>, 上木 厚子<sup>1</sup>, 上木 勝司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山形大・農, <sup>2</sup>山自販RC

〔はじめに〕自動車エンジンの冷却装置内を循環するクーラントは、有毒なエチレングリコールを主成分としており、交換や廃車の際に大量に廃棄処理されている。また、自動車の整備・解体施設では、漏れた廃油の混入した廃水が大量に発生しており、その処理が問題となっている。本研究では、クーラントや廃油混入廃水をメタン発酵処理することで、エネルギーとして利用可能なメタンを回収できないか検討した。

〔材料と方法〕メタン発酵のための微生物源として都市下水汚泥嫌気消化槽から採取した汚泥を用いた。試験管中で汚泥 5 mL と嫌氣的滅菌水 (N<sub>2</sub>を通気してO<sub>2</sub>を追い出した滅菌蒸留水) 5 mL を混合してスラリー試料を調製し、嫌氣的に 30℃ で保温した。この時にエチレングリコール試薬またはクーラントを様々な濃度で添加してメタン生成量への影響を比較した。廃油混入廃水のメタン発酵試験は以下の手順で行った。まず、4 mL の汚泥に対して 0.1、0.2、0.5、2 または 5 mL の廃油混入廃水を加え、嫌氣的滅菌水で 10 mL とした。これを嫌氣的に 30℃ で保温してメタン生成量を比較した。メタン生成量と揮発性脂肪酸の濃度は、TCD および FID 検出器を備えたガスクロマトグラフでそれぞれ測定した。

〔結果〕エチレングリコール濃度が 0.1、0.2、0.5、1、5、10 および 20% (v/v) となるようにエチレングリコール試薬またはクーラントをスラリー試料に添加して 30℃ で保温したところ、0.1% 添加試料と 0.2% 添加試料では添加量に応じて無添加よりも多くのメタンが生成されたが、0.5~5% 添加試料では酢酸塩が蓄積して pH が大幅に低下したためメタン生成が抑制された。また、10% および 20% 添加試料ではメタン生成と酢酸生成はほぼ完全に阻害された。これらのことから、メタン発酵におけるエチレングリコールの適正濃度は 0.2% 程度以下と考えられた。オイル混入廃水を汚泥に添加すると、無添加の場合よりも多くのメタンが生成され、50% 添加でもメタン生成は阻害されないことが分かった。

以上の結果から、メタン発酵によりエチレングリコールおよび廃油含有廃水からメタンを得るための基礎的な情報が得られた。PCR-DGGE 解析により各保温試料中の微生物群集構造解析を行った結果についても報告する予定である。

## P-006

# Metagenomics reveals metabolic capacity of methanogenic microbiota in a bioreactor treating soy sauce-processing wastewater

○Takashi Narihiro<sup>1</sup>, Masaru K. Nobu<sup>2</sup>, Kyohei Kuroda<sup>3</sup>, Atsushi Tobo<sup>4</sup>, Wen-Tso Liu<sup>2</sup>, Masayoshi Yamada<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bioproduction Res. Inst., AIST, <sup>2</sup>Univ. Illinois at Urbana-Champaign, USA, <sup>3</sup>Natl. Inst. Technol., Kitakyushu College, Japan, <sup>4</sup>Natl. Inst. Technol., Kagoshima College, Japan

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

Metagenomic analysis of a methanogenic microbial community in an anaerobic bioreactor treating amino acid-containing soy sauce-processing wastewater revealed synergistic metabolic network of syntrophic substrate-oxidizing bacteria (syntrophs), methanogenic archaea (methanogens), and functionally unknown microorganisms. A laboratory-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor fed with wastewater discharged from soy sauce processing manufactory was operated at 20°C. 16S rRNA gene amplicon analysis has shown that the majority of microorganisms are assigned into the phyla *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Synergistetes*, and *Bacteroidetes* (Tobo et al., presentation at 2016 JSME annual meeting). Metagenomic shotgun sequencing was performed by Illumina MiSeq sequencer. We successfully recovered metagenomic bins of dominant microbes in the reactor, including *Euryarchaeota* methanogens (*Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, and *Methanobacterium*), *Syntrophomonadaceae*- and *Pelotomaculum*- related syntrophs, and other bacterial members associated with the *Synergistetes* and *Bacteroidetes*. Metabolic reconstruction suggested that these organisms perform fermentative and syntrophic degradation of amino acids and catabolic by-products facilitated by various energy conservation systems. *Bacteroidetes* and *Synergistetes* organisms could ferment or syntrophically degrade amino acids. *Syntrophomonadaceae* and *Pelotomaculum* could utilize the by-products branched-chain and short-chain fatty acids presumably derived from the degradation of amino acids. Acetate and hydrogen were further converted to methane by acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens. Thus, diverse anaerobic organisms may unite to form a metabolic network to perform complete degradation of amino acids in the methanogenic microbiota.

## P-007

# Stable Isotope Probingによるベンゼン、トルエン、ジクロロメタン 複合汚染分解微生物の同定

○吉川 美穂<sup>1</sup>, 張 銘<sup>1</sup>, 栗栖 太<sup>2</sup>, 豊田 剛己<sup>3</sup>

<sup>1</sup>産総研, <sup>2</sup>東大, <sup>3</sup>東京農工大・院

バイオレメディエーションは、微生物により地下水や土壌中の汚染物質を浄化する低コストな技術である。バイオレメディエーションに関する研究の多くが、単一の汚染物質、または単一の汚染物質とその分解産物を対象としているが、実際の汚染サイトには複数の汚染物質による複合汚染が数多く存在する。複合汚染時に各汚染物質を分解する微生物を特定することを目的に、本研究を行った。

本研究ではベンゼン、トルエン、ジクロロメタンの3種の汚染物質を対象とし、これらを好気分解する微生物コンソーシアムを確立した。同一の土壌を接種源として、常に好気条件で培養したコンソーシアム (AE/AE) および嫌気条件と好気条件を交互に繰り返して培養したコンソーシアム (AN/AE) の2種類を作製した。分解微生物の特定にはStable Isotope Probingを用いた。好気条件下で各コンソーシアムに3種の汚染物質を添加し、そのうち1種類は<sup>13</sup>Cでラベル化したものを用いた。また、全て<sup>12</sup>Cの汚染物質を添加した対照系も作製した。汚染物質分解の進捗に合わせてコンソーシアムからDNAを抽出し、超遠心分離により浮遊密度が連続的に異なる18画分に分画した。各画分の微生物叢は制限酵素HhaIを使用したT-RFLPで解析し、得られたT-RFsはクローン解析により同定した。

AE/AEに<sup>13</sup>C-ベンゼンを添加したケースでは352bp、<sup>13</sup>C-ジクロロメタンを添加したケースでは337bpのT-RFで、DNA量のピークが対照系より重比重画分へシフトした。AN/AEへ<sup>13</sup>C-ベンゼン、<sup>13</sup>C-トルエンを添加したケースでは、それぞれ201、558bpのT-RFで重比重画分へシフトした。AE/AEの<sup>13</sup>C-トルエンおよびAN/AEの<sup>13</sup>C-ジクロロメタン添加のケースではシフトは確認されなかった。クローン解析の結果、352、337、201、558bpのT-RFはそれぞれ、*Propioniferax* sp.、*Hyphomicrobium* sp.、*Pseudomonas* sp.、および*Pseudomonas stutzeri*と同定された。

以上の結果より、ベンゼン、トルエン、ジクロロメタン共存下で、常に好気条件で培養した場合では、*Propioniferax* sp.がベンゼン分解、*Hyphomicrobium* sp.がジクロロメタン分解を担っていると示唆された。一方、嫌気条件と好気条件を繰り返して培養した場合では、*Pseudomonas* sp.がベンゼン分解、*P. stutzeri*がトルエン分解を行っている と推測された。常に好気条件下にある場合と酸素条件に変動がある場合とでは、異なる微生物が複合汚染の分解に寄与していると考えられた。



## P-008

# 海底堆積物中における CO<sub>2</sub>応答微生物の特定と挙動モデル化の試み

○中村 孝道<sup>1</sup>, 秋山 克<sup>2</sup>

<sup>1</sup>地球環境研・CO<sub>2</sub>貯留, <sup>2</sup>地層科学研

E-mail: tak-nakamura@rite.or.jp

《背景》CO<sub>2</sub>の早期大量削減を目的として、分離回収したCO<sub>2</sub>を地下空間に貯留隔離するCCS技術が世界的に実用化され始めている。北米、中東および中国では枯渇油層を対象とした原油増進回収（EOR）を目的としたCO<sub>2</sub>-EORの実施が盛んであり、陸域にてCCSが展開されている。一方、北欧、英国等の欧州の一部では北海における海底下枯渇油ガス層を主な対象とし、海域にてCCSが展開されている。日本におけるCCSの実施は海底下帯水層を対象と考えられており、2016年4月より海域CCSの実証試験が始まっている。CCS実施の際には、事前に環境影響を予測・評価すること、継続的に環境影響の監視を行うことが求められている。海域における環境影響評価手段としては物理的、化学的、生物学的手法が考えられている。生物学的手法は環境影響の指標として活用が期待されており、漏出を想定したCO<sub>2</sub>放出実験によって海底堆積物中の微生物群集の応答性が調査されている（Tait et al. 2015）。《目的》海底下帯水層におけるCO<sub>2</sub>貯留の環境影響評価の一環として、漏出を想定した局所的CO<sub>2</sub>濃度上昇による海底堆積物中の微生物群集への影響を評価することを目的とした。海底堆積物を対象とした高濃度CO<sub>2</sub>曝露実験を実施し、CO<sub>2</sub>に応答する微生物種の特定を試み、さらにCO<sub>2</sub>濃度に応じた増減挙動のモデル化を試みた。《方法》沿岸海底モデルとして日本海域の沿岸域底泥を対象試料とし採取し、対照区（pCO<sub>2</sub>: 400 μ atm）および複数の高CO<sub>2</sub>海水区（1,000, 5,000, 10,000 μ atm）の曝露水槽に設置することで海底堆積物のCO<sub>2</sub>曝露実験を実施した。曝露試料を定期的にサンプリングし、微生物DNAを抽出し遺伝子解析を介して各試料中の微生物群集構造を比較した。CO<sub>2</sub>濃度の特異的に応答していると考えられる微生物種については、微生物反応シミュレーションを用いて増減挙動を予測した。《結果》CO<sub>2</sub>濃度上昇によって、微生物群集への大きな影響は観察されなかった。しかし、存在比の変動とCO<sub>2</sub>濃度の関係を精査することでCO<sub>2</sub>の曝露に応答すると推定される微生物を14種抽出することができた。それらのなかには、光合成細菌と硝化細菌が含まれていることが推定された。モデルケースとしてこれらの反応のモデル化を行ったところ、CO<sub>2</sub>濃度に応じた増減挙動を再現することができた。まだ精度は低い段階ではあるが、これらの結果を基にすればCO<sub>2</sub>濃度上昇による生物影響の指標化が可能になると考えられる。

## P-009

# Substrate utilization kinetics and microbial community dynamics in solid-phase denitrification processes acclimated to different copolymers of polyhydroxyalkanoates

○ Akira Hiraishi<sup>1</sup>, Shun Sakai<sup>1</sup>, Masaki Takita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. Tech., <sup>2</sup>Corp. R&D Planning Admin. Div., KANEKA CORP.

E-mail: hiraishi@ens.tut.ac.jp

Solid-phase denitrification (SPD) processes using biodegradable polymers as the solid substrate have great promise in wastewater treatment technology for nitrogen removal. A copolymer group of polyhydroxyalkanoates (PHAs) has been most widely used as the substrate for this purpose because of their excellent biodegradability. This study was undertaken to characterize poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)- and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)-acclimated SPD processes with respect to substrate specificity for nitrate removal and microbial community dynamics. **Methods.** Sequencing-batch SPD reactors were constructed using screw-capped glass bottles seeded with activated sludge and cultivated semi-anaerobically with nitrate-containing mineral medium and PHBH and PHBV flakes (1%, w/v). Nitrate removal activity was determined in vial tests with different concentrations of lower fatty acids as the substrate. Changes in microbial community structure was studied by quinone profiling and 16S rRNA gene amplicon analysis using the Illumina MiSeq platform. **Results and Discussion.** The PHBH- and PHBV-acclimated SPD reactors constructed exhibited good performance of nitrate removal in every batch cycle. Vial tests with different lower fatty acids showed that the PHBH- and PHBV-acclimated cultures had the highest  $V_{max}$  with acetate and butyrate for nitrate removal but differed in substrate specificity in  $K_s$ . Quinone profiling showed that the PHBH- and PHBV-acclimated reactors contained Q-8 as the most abundant component but differed from one another in proportions of Q-9 and Q-10. Amplicon analyses showed that members of *Betaproteobacteria* predominated in both the reactors. These results suggest that microbial community structure and activity in PHA-acclimated SPD processes are relatively stable; nevertheless, small but significant changes take place depending upon the kind of copolymers used for acclimation.

## P-010

## 亜酸化窒素還元に寄与する脱窒細菌の亜酸化窒素と酸素を巡るダイナミクスの動力的評価

○末永 俊和<sup>1</sup>, 堀 知行<sup>2</sup>, 利谷 翔平<sup>1</sup>, 細見 正明<sup>1</sup>, 寺田 昭彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大・院工, <sup>2</sup>産総研

E-mail: s150581w@st.go.tuat.ac.jp

亜酸化窒素(通称:N<sub>2</sub>O)は21世紀最大のオゾン層破壊物質であり、強力な地球温暖化物質として注目されている。N<sub>2</sub>OをN<sub>2</sub>に還元する経路は脱窒反応の最終段階であるN<sub>2</sub>O還元反応のみと言われており、この反応を担うN<sub>2</sub>O還元細菌を利用したN<sub>2</sub>O放出抑制技術への応用が期待される。近年、N<sub>2</sub>O還元酵素機能遺伝子(nosZ)の配列解析により、N<sub>2</sub>O還元細菌は大きく2つのグループに分類されることが明らかとなった。一方で、この分類の違いが生理学的特性に与える影響は明らかになっていない。我々のこれまでの研究でclade II typeのnosZを有する、Rhodocyclaseae科のDechloromonas sp., Azospira sp.を活性汚泥から集積培養を経ることで獲得した。そこで本研究では、これらの単離株のN<sub>2</sub>O還元活性を動力的観点からの比較評価する。特に、O<sub>2</sub>が存在する環境からN<sub>2</sub>O還元活性が発現するダイナミクスを追跡した。実験では獲得した単離株に加えて、Pseudomonas stutzeri, Paracoccus denitrificansをnosZ clade I typeの脱窒細菌として選択した。微小電極を用いたMicro-respiration system (Unisense社)により、N<sub>2</sub>OとO<sub>2</sub>プロファイルを同時測定した。得られたプロファイルをMonod式にフィッティングすることでN<sub>2</sub>O最大消費速度V<sub>m,N<sub>2</sub>O</sub>とN<sub>2</sub>Oに対する半飽和定数K<sub>m,N<sub>2</sub>O</sub>の算出を算出した。Azospira sp., Dechloromonas sp.はK<sub>m,N<sub>2</sub>O</sub>が0.8 - 4.2 μMと高い親和性を示したのに対して、Pa.denitrificansは35 μMとN<sub>2</sub>Oに対する親和性が低いことが明らかとなった。またPs. stutzeriはK<sub>m,N<sub>2</sub>O</sub>=4.0 μM, V<sub>m,N<sub>2</sub>O</sub>においてもclade IIと比較して有意差は認められなかったものの、O<sub>2</sub>が完全に消費されてから最大N<sub>2</sub>O消費速度を発揮するまでに4時間以上という長い時間が必要となることが示唆された。これらの結果を比較するために、Monod式に加えて、酵素の合成・活性化とO<sub>2</sub>阻害を表現したモデル(Enzyme-explicit denitrification model)を適用し、シミュレーションによりclade IIに属する種はO<sub>2</sub>阻害からの回復能力が高い傾向が示された。一方でO<sub>2</sub>阻害の度合は菌種間で異なり、nosZ typeには依存しないことが示唆された。今回nosZ clade II typeの細菌株において、N<sub>2</sub>Oへの高い親和性、またはO<sub>2</sub>阻害からの回復が早いことが定量的に明らかとなり、nosZ clade II typeがO<sub>2</sub>濃度がダイナミックに変動するような環境中でN<sub>2</sub>O消費を担える可能性が示された。

## P-011

## 醤油製造廃水を処理対象とした低温 UASB 反応器内グラニューール汚泥の微生物群集構造解析

○當房 陸<sup>1</sup>, 山田 真義<sup>1</sup>, 黒田 恭平<sup>2</sup>, 成廣 隆<sup>3</sup>, 山内 正仁<sup>1</sup>, 平片 悠河<sup>4</sup>

<sup>1</sup>鹿児島工業高等専門学校, <sup>2</sup>北九州工業高等専門学校, <sup>3</sup>産業総合技術研究所, <sup>4</sup>長岡技術科学大学

E-mail: b11183@kagoshima-ct.ac.jp

【目的】醤油は日本で年間約80万kL生産されている調味料である。一般的な醤油の製造最終段階で珪藻土ろ過を行うが、この過程で発生した残存廃水は透明度が低く、高いCOD濃度(約150,000 mgCOD/L)をもつ有機性廃水である(以下、醤油製造廃水)。本研究では、低温嫌気性上昇流汚泥法(UASB)と下降流スポンジ懸垂法(DHS)を組み合わせた低温UASB-DHSシステムにより醤油製造廃水の連続処理実験を行い、その処理性能の評価を行った。また、UASB反応器内のグラニューール汚泥を構成する微生物の群集構造を解析し、本システム内の有機物分解機構の解明に繋がる微生物学的知見の収集を試みた。【方法及び結果】Gas Solids Separatorを含めたUASB反応器の液容積は10L、DHS反応器のスポンジ容積は20.8Lとした。UASB反応器は20℃に制御し、DHS反応器内は無加温で外気温に依存するものとした。UASB反応器には中温条件(35℃)で醤油製造模擬廃水を処理していたグラニューール汚泥、DHS反応器には下水処理場の返送汚泥を植種した。処理対象としている醤油製造廃水は市販の醤油とほぼ同等の組成であるため、市販の醤油を水道水で希釈したものを供給廃水として用いた。供給廃水のpH調整にはNaOH(24%)を用いてUASB反応器内のpHが6.5-7.5に維持されるように調整した。また、UASB反応器のCOD容積負荷は、供給廃水のCOD濃度の上昇及びHRTの短縮によって3.6から24 kgCOD/m<sup>3</sup>/dayに段階的に上昇させた。UASBグラニューール汚泥のサンプリングは、運転248日目、397日目、783日目、906日目に行った。その結果、本システムは、流入COD濃度6,000 mgCOD/L及びCOD容積負荷24 kgCOD/m<sup>3</sup>/dayの条件下で87±7%のCOD除去率を達成した。また、Illumina MiSeqを用いた16S rRNA遺伝子アンプリコン解析の結果、UASB反応器内では、全運転期間に渡り*Euryarchaeota*門、*Firmicutes*門、*Synergistetes*門、*Bacteroidetes*門に属する微生物が優占して検出されており、これらの微生物群が醤油製造廃水に含まれる有機物の分解を担っていることが示唆された。



## P-012

# 浄水処理における生物活性炭ろ過水中の微生物群集構造の深度方向変化

○鈴木 美有<sup>1</sup>, 春日 郁朗<sup>1</sup>, 栗栖 太<sup>2</sup>, 古米 弘明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東大・院工・都市工, <sup>2</sup>東大・院工・水環セ

E-mail: yu.suzuki.27@gmail.com

大都市を中心として、オゾン処理と生物活性炭（Biological Activated Carbon：BAC）ろ過処理からなる高度浄水処理が普及している。BACろ過では有機物の吸着と共に、活性炭に付着した微生物による生物処理が進行するが、生物処理に関与する微生物の実体は把握されていない。BACろ過では、活性炭上で増殖活性の高い微生物が増殖・剥離してろ過水に流出し、ろ過水中の微生物数が深度方向に増加することが観察されている。本研究では、複数の浄水場のBACろ過層を対象として、ろ過水中の微生物群集構造の深度方向変化を比較した。

2015年10月～11月に、国内の4つの浄水場のBACろ過層（BAC-A～BAC-D）から深度方向50 cmごとくろ過水を採水した。ろ過水中の全菌数を計数し、微生物群集構造を16S rRNA遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンシングによって解析した。

いずれのBACろ過層でも、BAC流入水中の全菌数は定量下限（ $10^3$  cells/mL）程度であったが、50 cmろ過水では $10^4$ ～ $10^5$  cells/mLまで増加した。全菌数の増加は0～50 cm区間で最も大きく、BAC層全体での増加量の32～74%を占めていた。ろ過水中の微生物群集構造解析の結果、流入水と50cmろ過水では群集構造が大きく変化していた。ろ過水中の全菌数と各微生物群の相対割合を掛け合わせることで、深度方向における微生物群別の増加量を推定した。全菌数増加が顕著であった0～50 cm区間では、Rhizobiales目（BAC-A、BAC-B）、Burkholderiales目（BAC-C）、Sphingomonadales目（BAC-D）の増加が最大であり、表層の増殖・剥離の傾向には差異がみられた。なお、BAC-Bを除き、これらの微生物群の増加量は、50 cm以深では少なかった。BAC-A、B、Dでは0～50 cm区間とろ過層全体で増加が最大であった微生物群が一致していたが、BAC-Cではろ過層全体ではBdellovibrionales目の増加量が最大であり、表層以深での増加量も多いことが示唆された。このようにBACろ過層によって異なるろ過水中の微生物群集構造は、生物処理機構の差異を反映していると考えられる。

## P-013

### 活性汚泥内に存在する Candidate division 細菌群の FISH 法を用いた可視化

○西村 恭平<sup>1</sup>, 金田一 智規<sup>1</sup>, 大橋 晶良<sup>1</sup>, 尾崎 則篤<sup>1</sup>, 青井 義輝<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大・院工, <sup>2</sup>広島大・サステナセンター

E-mail: m160082@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 広島県のある下水処理場の活性汚泥に対して次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析を行ったところ、Candidate division 細菌群が数種類、一定量存在することが明らかになった。そこで本研究では上記下水処理場の活性汚泥内で存在割合が比較的高かった Candidate division SR1、OD1、BD1-5 に着目して、詳細な系統分類、subdivision の提案、新たに設計した FISH による活性汚泥内 in situ の可視化を行い、他の細菌との共存関係を明らかにすることを目的とする。【方法】 着目した 3 つの細菌群に対して、16S rRNA 遺伝子の増幅、クローニング、系統樹の作成を行った。その後 ARB ソフトを用いて FISH プロブの設計を行った。設計できたそれぞれの FISH プロブに対して、clone-FISH 法を用いて最適ホルムアミド濃度を算出した。最適ホルムアミド濃度で活性汚泥の FISH 観察を行い、プロブの検出範囲に応じて二重染色を行った。【結果】 SR1 と BD1-5 の細菌群は、他の活性汚泥から検出されたクローンとその近縁種を網羅するような FISH プロブを設計できた。SR1 門はいくつかのプロブの候補のうちアクセシビリティが高く、ハイブリタイゼーション効率が 1 に近く、推定ホルムアミド濃度も 20% 前後でカバー率も 100% に近い値となった SR-929、SR-393 プロブを用いることで、活性汚泥の中の SR1 細菌群を可視化できた。BD1-5 門も同様に、BD-686、BD-95 の二つのプロブを用いることで活性汚泥内の BD1-5 を可視化することに成功した。【展望】 それぞれの細菌群に特異的な FISH プロブを用いて MAR ? FISH 法を行い、基質利用特性を把握し、集積培養を行う。

## P-014

**De novo meta-RNA-seq で混沌とした微生物コミュニティにおける微生物の働きや微生物同士の関係性をみる**

○佐藤 由也<sup>1</sup>, 堀 知行<sup>1</sup>, 小池 英明<sup>2</sup>, Ronald R Navarro<sup>1</sup>, 柳澤 真紀<sup>1</sup>, 松尾 和幸<sup>1</sup>, 尾形 敦<sup>1</sup>, 羽部 浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>産総研・環境管理, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス

複雑な微生物コミュニティの中で「個々の微生物が何をしているか」を理解することは、微生物生態学における大きなチャレンジである。活性汚泥は100年以上にわたり世界中で水処理に利用されてきた、最も身近で重要なバイオテクノロジーである。一方、数千種類以上の微生物が混在する極めて複雑な微生物コミュニティであり、その性質については理解が進んでいない部分が多い。しかし、水不足が世界で大きな問題となっている現在、活性汚泥微生物の体系的な理解に基づき、水処理プロセスを最適化することには大きな意義がある。そこで本研究では、複雑な活性汚泥における微生物の働きを明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) に取り組んだ。従来、RNA-seqには対象微生物のゲノム情報が必要であり、ゲノム情報の乏しい活性汚泥の解析は困難であったが、本研究では鋳型ゲノムに依存しない手法 (*de novo* RNA-seq) を世界に先駆けて適用した。

対象としたのは難分解性の重油含有廃水を処理するリアクターである。現在、産業廃水を高度処理して再利用することに需要があるが、廃水に重油が混入することで微生物の処理能が低下することが問題となっている。2基の水処理リアクター (Reactor 1, 2) を用い、同じ条件で重油含有廃水処理を行ったにもかかわらず、Reactor 1 と Reactor 2 では重油の分解効率に大きな差が見られた。Reactor 2 では重油の主成分であるアルカンや多環芳香族化合物が残存し処理能が低かった一方で、Reactor 1 ではそれらの蓄積はほとんど見られず、効率的に重油分解が行われていた。遺伝子発現解析の結果、脱窒菌が重油の分解を担っていることが明らかになったが、その存在量や分解酵素の発現量は両リアクター間で大差なかった。しかし、脱窒菌の呼吸基質である硝酸イオンの供給系 (アンモニア酸化) の活性は Reactor 1 でだけ高く、これによって重油分解活性が促進されていたことがわかった。興味深いことにアンモニア酸化菌の存在量は全体の0.15%未満であり、このマイナー種によってリアクター全体の重油処理能が左右されていた。

## P-015

# 膜分離活性汚泥法による高濃度油含有実廃水処理の効率化に関する候補微生物群

○田中 亮一<sup>1,2</sup>, 納寄 克也<sup>1</sup>, Ronald Navarro<sup>2</sup>, 稲葉 知大<sup>2</sup>, 尾形 敦<sup>2</sup>, 柳下 宏<sup>3</sup>, 堀 知行<sup>2</sup>, 羽部 浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>熊本県産業技術センター, <sup>2</sup>産総研・環境管理, <sup>3</sup>産総研・中国センター

【目的】油分解に関与する好気微生物の研究は数多く行われ、廃水処理中から多くの油分解菌が分離・解析されてきた。しかし、油を高濃度で含む実廃水処理において微生物群集の動態に関する知見は乏しい。一方、省スペース・高効率の処理法である膜分離活性汚泥法（Membrane bioreactor：MBR）が近年注目されている。しかし、MBRの問題点として膜の目詰まり（ファウリング）があり、油や微生物自体がその要因として報告されている。そこで本研究では、高濃度油含有実廃水として拉麺廃液に着目し、そのMBRによる処理試験を行った。廃水処理における油濃度上昇に付随した微生物群集遷移を解析し、実廃水中の油分解に中心的に関与する微生物群を推定した。

【方法・結果】27L容量のMBRに拉麺廃液を水理的滞留時間5.4日で流入させ、約1ヶ月間運転を継続した。この間、廃液中の油濃度を135 mg/L（廃液原液の200倍希釈）から2700 mg/L（10倍希釈）まで段階的に引き上げた。MLSS、DO、TOC、膜間差圧を連続的に追跡したところ、油濃度135 mg/Lまでは、緩やかなMLSSの上昇が観察されるとともに、処理水のTOCが10 mg/L以下に保たれ、安定的な処理状態が観察された。しかし、油濃度2700 mg/LではMLSSの急激な増加に伴って膜間差圧が上昇し（膜ファウリングが起こり）、処理能の低下が見られた。16S rRNA遺伝子に基づく次世代シーケンサー（MiSeq Illumina）解析において、門および綱レベルで系統的に特徴づけたところ、油濃度の段階的増加に伴う群集構造の劇的な変化が見出された。また、OUT(operational taxonomic unit)レベル解析の結果、油濃度上昇とともに増殖する微生物が3種同定された。最も増加率が高かったものは、最終油濃度2700 mg/Lで全体の26%を占め、他の2種も10%弱を占めていることが明らかとなり、これら微生物群が拉麺廃液処理の効率化に重要である可能性が示唆された。



## P-016

### **Shift between extracellular electron discharge and uptake by electrode-associated *Geobacter metallireducens* biofilms**

○Hiroyuki Kashima<sup>1</sup>, John M. Regan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Subsurface Geobiology Analysis and Research, JAMSTEC,

<sup>2</sup>Dept. of Civil & Environ. Eng., The Pennsylvania State University

E-mail: kashimah@jamstec.go.jp

The characterization of electrode-mediated microbial reactions has important implications to understanding extracellular electron transfer (EET) reactions potentially occurring in natural settings and also to developing stable bioelectrochemical systems that exploit such EET reactions. One pertinent question is how EET-capable microbes respond to changes in the environment. For example, do EET microbes differentially interact with extracellular substrates, such as minerals or electrodes, under different electrochemical conditions? This study focused on temporal changes between the extracellular discharge of electrons from cells to the environment (anode reduction) and the uptake of electrons from the environment (cathode oxidation) by EET-capable cells colonized on electrodes. Namely, we investigated a metabolic shift in anodically grown *Geobacter metallireducens* biofilms from anode reduction to cathode oxidation in tests with potentiostatically controlled graphite electrodes. *G. metallireducens* biofilms demonstrated a quick and reversible shift between anode reduction and cathode oxidation as a function of electrode potential and availability of nitrate and acetate, which are co-substrates associated with anodic/cathodic reactions. Cathode oxidation was coupled with nitrate reduction by metabolically active biofilms, with a large cathodic current density that was of comparable magnitude to the one recorded in anodic operation of the same biofilm. A quick shift from anode reduction to nitrate-dependent cathode oxidation was thought to be enabled by the presence of nitrate-reducing enzyme activity in the anode-reducing biofilm cells without prior exposure to nitrate. Cyclic voltammetry and the analysis of its first derivative provided insights into electron transfer mechanisms of these biofilms.

## P-017

***Lactobacillus plantarum*環境単離株における莢膜合成量の変化に伴ったコロニー形態の相変異機構**

○江橋 由夏<sup>1</sup>, 河嶋 伊都子<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>1</sup>, 久保田 浩美<sup>2</sup>, 清川 達則<sup>1</sup>, 八城 勢造<sup>2</sup>, 永井 智<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>花王・安全性科学研

乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* は、食品加工に利用される一方、食品変敗を引き起こす有害菌として報告されている。本菌を含め多くの微生物は実環境中でバイオフィルム (BF) を形成し集団で生息している。さらに本菌は BF 形成により様々なストレスに対する耐性が上昇することが明らかとなっており、*L. plantarum* の BF 状態における生態的知見が乳酸菌の制御に重要であるといえる。

先行研究において、実環境中から単離した *L. plantarum* では、粘着性が低く広がり小さいコロニー (Compact colony: Cc) と、粘着性の高いコロニー (Mucoid colony: Mc) が存在し、両者は相変異することが新規に明らかとなった。また Cc と Mc がそれぞれ形成する BF では、その構造やストレスに対する感受性、基質への付着能が異なることが示された。さらに Cc に比べ Mc では莢膜の合成に関与する *cps2* オペロンの発現量が上昇しており、実際に Mc で莢膜の合成量が増加していることが観察された。これより莢膜合成量の変化に伴う相変異が BF の構造や性質を変化させることが考えられた。そこで本研究では *L. plantarum* 環境単離株における莢膜合成の調節機構の解明を目的とし、乳酸菌 BF の制御に繋がる知見を得ることとした。

まず初めに莢膜合成に関与している *cps2* オペロンの ORF とその上流配列を Cc と Mc で比較した。その結果 *cps2* オペロン上流の一部配列に逆位が認められ、逆位配列中に  $\sigma^A$  プロモーター領域が推測された。また継代培養を経て得られた Cc、Mc においても同位置に配列逆位が確認され、部位特異的な配列逆位に伴った相変異が示された。さらに Cc、Mc の BF と浮遊状態において、Cc から Mc が出現する頻度及び Mc から Cc が出現する頻度を比較した。その結果、浮遊状態に比べ BF 中において Cc の出現頻度が上昇することが明らかとなり、BF 形成が配列逆位の調節に関与していると推測された。

本実験では単離した Cc と Mc を用いたが、実環境中の BF ではひとつの集団内に Cc と Mc が混在していると考えられる。このヘテロな BF の生態的意義として、*L. plantarum* の集団的生存戦略が示唆される。異なる性質を持つ菌体が同一集団中に同時に存在することで、様々なストレス存在下での集団の全滅を防いでいると考えられる。さらに相変異により BF 中に常に両者を保持することで、環境適応を図っていると推測される。

## P-018

### ウェルシュ菌におけるバイオフィルム細胞集団の不均一性

○尾花 望, 野村 暢彦

筑波大・生命環境

E-mail: obana.nozomu.gb@u.tsukuba.ac.jp

実環境中において多くの微生物は自身が生産する細胞外マトリクスに覆われたバイオフィルムを形成して生息している。グラム陽性偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌では外界の温度にตอบสนองしてバイオフィルムの形態が変化する。37° CではIV型線毛の発現が上昇し、基質に付着したバイオフィルムを形成する一方、25° Cでは繊維状細胞外マトリクスが産生され、耐性の向上したペリクル状バイオフィルムを形成する (Obana et al., 2014, J. Bacteriol.)。今回、我々は繊維状バイオフィルムマトリクスが*sipW*オペロン (*sipW-bsaABCRSD*) より産生されることを同定した。蛍光レポーター株を用いて*sipW*遺伝子発現を解析したところ、集団中において*sipW*発現細胞と非発現細胞が混在する双安定な発現パターンを示した。また、集団中に占める*sipW*発現亜集団は37° Cより低い温度で出現し、その細胞数は温度の低下に従って増加した。一方*sipW*オペロン内に存在する*bsaRS*二成分制御系欠損株では*sipW*発現が消失したことから、BsaRSによる自己調節機構が双安定な発現パターンに必須であると考えられた。さらに宿主細胞への付着に関与するIV型線毛 (*pilA2*) の欠損株ではほぼすべての細胞において*sipW*発現が認められた。以上のことより、細胞集団の不均一性の制御は、ウェルシュ菌において環境 (宿主内もしくは外) に応じた生活様式 (付着、もしくはバイオフィルムマトリクス産生によるストレス防御) の決定を担っていると考えられる。

## P-019

***Chromobacterium violaceum*はセンサーキナーゼを用いて多様な言語(AHL)に応答する**○島村 裕子<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>1</sup>, 諸星 智広<sup>2</sup>, 池田 宰<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>1</sup><sup>1</sup>筑波大・院生命環境, <sup>2</sup>宇都宮大・院工

多くの細菌は集団中において、低分子化合物であるシグナル物質を「言葉」として細胞外に生産し、周囲の細菌が「聞く耳」となる特異的なレセプターを介してシグナル物質を受け取ることによりコミュニケーションをとる。細菌は細胞間コミュニケーションの一種であるクオラムセンシングというシステムにより、シグナル物質を生産、感知、応答し、シグナル物質の濃度が閾値に達すると、遺伝子発現そして集団行動を一斉に変化させる。クオラムセンシングは様々な遺伝子を制御し、細菌の毒素生産や医療現場などで問題となるバイオフィーム形成にも関与する。クオラムセンシングを行う際に重要であるのが、シグナル物質を感知することである。グラム陰性細菌では一般的に、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)がシグナル物質として利用され、各シグナル物質に対し特異的なレセプターが対応する。グラム陰性細菌である *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 株は側鎖の長さが異なる様々な長鎖AHLに応答するが、解明されているレセプターは細胞内のレセプター CviRのみである。そこで、本研究では ATCC 12472 株がどのような機構で多様な言語(AHL)に応答するのか解析を行うことを目的とした。

その結果、新たに2つのセンサーキナーゼが多様なAHLの応答に関与することを示し、前大会ではそれがCviRを介してクオラムセンシングを制御する可能性までを報告した。本研究では、2つのセンサーキナーゼと二成分制御系の推定のペアであると考えられる2つのレスポンスレギュレーターについても解析した。一方のレスポンスレギュレーターを破壊すると応答性がセンサーキナーゼと同様に低下し、もう一方のレスポンスレギュレーターを破壊すると応答性が増加し、低濃度のAHL条件下においてもAHLを感知した。また、顕微鏡を用いて一細胞レベルで応答性を観察したところ、センサーキナーゼの破壊株ではほとんどの細胞で応答性が低下していた。これらの結果より、2つの推定の二成分制御系がAHLの応答、そしてクオラムセンシングの制御に関与していることが示唆された。*C. violaceum*はCviRだけでなくこれらの2つの二成分制御系を用いて、多様な言語(AHL)の“リスニング能力”を上げることで、環境適応していると考えられる。

## P-020

**超高速化量子分子動力学法に基づくマルチスケール計算化学による  
バイオフィーム成長シミュレーション**

○佐藤 亮, 長山 千恵子, 畑 北斗, 石澤 由紀江, ボノー パトリック, 三浦 隆治, 鈴木 愛, 畠山 望,  
宮本 明

東北大・NICHe

便器など、生活空間の水回りの汚れは、分子レベルの目に見えない汚れが起点となり、最終的にバイオフィームと呼ばれる汚れに成長する。本研究では、分子レベルの目に見えない汚れから、実スケールのバイオフィームまでの汚れ蓄積を解析できる、マルチスケールシミュレータを開発した。分子レベルの汚れを解析する計算手法は、超高速量子分子動力学法(UA-QCMD)を使用する。UA-QCMDは独自のTight-Binding近似により、原子軌道の形状とイオン化ポテンシャルをパラメータ化する事で、従来の密度汎関数法に基づく第一原理的手法と比較して、1000万倍高速に計算できる。またそれによって、より大規模な系を計算することが可能となった。この手法によって、基材表面とバイオフィームを構成する物質との結合状態や、結合力、またバイオフィームを構成する物質内部の結合力を分子レベルで評価できる。実スケールの汚れ蓄積を解析する計算手法は、キネティックモンテカルロ法を使用する。キネティックモンテカルロ法とは、確率論と乱数を用いて粒子の発生と移動などの施行を連続して行い、時間変化も考慮できるように拡張されたモンテカルロ法である。この計算手法では、基材表面のバイオフィームを球状粒子として表現する。初期状態は、基材表面のランダムな位置にバイオフィームの基となる菌体粒子を配置する。単位時間あたりのバイオフィーム成長量を計算し、時間経過と共に、バイオフィーム粒子を増やしたり、大きくすることでバイオフィームの成長を実時間スケール・実スケールで評価できる。また、流体計算結果から得られたせん断応力によって、バイオフィームの剥がれる量を計算することが可能で、バイオフィームの成長から剥離を連続的に計算できる。現在、前述した分子レベルでの計算で得られた、基材表面とバイオフィームを構成する物質との結合力や、バイオフィームを構成する物質内の結合力を考慮することによって、汚れの剥がれやすさを実スケールで評価する試みも検討している。このように、分子レベルの目に見えない汚れから実スケールのバイオフィームまで、マルチスケールでの汚れの成長挙動や剥がれやすさなどを解析可能なシミュレータを開発することで、理論に基づいた汚れの特性評価が可能となった。



## P-021

**Paenibacillus属細菌はバイオフィルム中に耐性の高い芽胞を形成する**

○加藤 寛子<sup>1</sup>, 横山 佳奈<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>3</sup>, 久保田 浩美<sup>2</sup>, 八城 勢造<sup>2</sup>, 永井 智<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>花王株式会社・安全性科学研究所, <sup>3</sup>筑波大・生命環境系

細菌が形成する芽胞は、栄養細胞に比べて熱や薬剤に対して高い耐性を有している。食品業界では芽胞の殺菌剤として過酢酸が用いられる。しかし、*Paenibacillus*属細菌の芽胞は過酢酸に対しても耐性を有することから、食品腐敗菌として問題視されている。当研究室先行研究により、*Paenibacillus*属細菌はバイオフィルム形成能を有しており、さらにその内部にも芽胞を形成することが明らかとなった。実環境中において微生物の大多数がバイオフィルムを形成して生育していることから、我々はバイオフィルム由来芽胞の特性を理解することが重要であると考へた。そこで本研究では、*Paenibacillus*属細菌のバイオフィルム中に形成される芽胞の解析を行った。

*P. polymyxa*と*P. chibensis*のバイオフィルム及び浮遊菌由来芽胞を位相差顕微鏡で観察したところ、バイオフィルム由来芽胞の方が長径が長いことが明らかとなった。さらに、TEM観察によって、*P. polymyxa*の芽胞ではバイオフィルム由来芽胞の方が最外層構造であるcoatが厚いことが示された。coatは芽胞の耐性に関与することが知られているため、次に*P. polymyxa*のバイオフィルム由来及び浮遊菌由来の芽胞を精製し、その熱耐性と過酢酸耐性を比較した。その結果、バイオフィルム由来芽胞の方が耐性が高いことが明らかとなった。さらに、それぞれの芽胞の発芽効率を比較したところ、バイオフィルム由来芽胞の方が高い休眠性を有していた。枯草菌においては極めて休眠性の高いsuper dormant sporeの存在が報告されており、通常の芽胞より高い耐久性を有する。そのため、*P. polymyxa*のバイオフィルム由来芽胞にはより多くのsuper dormant sporeが存在し、耐性が向上していることが考えられた。また、*P. polymyxa*は食品製造装置に多く用いられる材質であるステンレス上にもバイオフィルムを形成し、その内部に芽胞を形成することが示された。

以上より、*Paenibacillus*属細菌はバイオフィルム中に浮遊菌と比較して耐性の高い芽胞を形成することが明らかとなった。バイオフィルム由来芽胞のcoat構造や高い休眠性はその耐性に寄与すると考えられる。本属菌は食品製造過程において、ステンレス上にバイオフィルムを形成し、その内部により耐性の高い芽胞を形成することで、加工食品へ混入及び残存する可能性が考えられた。

## P-022

## 環境中におけるメンブランベシクルを介した異種間相互作用の解析

○鬼澤 里奈<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>2</sup>, 森永 花菜<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系

近年、多くの細菌がメンブランベシクル (MV) を産生することが報告されている。MV とは、主に細胞膜によって形成される直径 20 ~ 400 nm の球体であり、タンパク質や脂質、DNA やシグナル物質などを含むことが知られている。また、MV は遺伝子の水平伝播や微生物間コミュニケーション、宿主との相互作用への寄与等の様々な機能を持つことが示されており、MV は細胞間相互作用において重要な役割を担っていると考えられる。これまでに報告されている MV 研究のほとんどが単離株を用いた限られた条件下におけるものである。その一方で、アメリカ東海岸沖および外洋の海水サンプルにおいて MV が豊富に存在するなど (Biller *et al.*, 2014), 実環境中にも多く存在し、微生物生態に深く関与している可能性がある。しかしながら、実環境中における MV の存在や機能に関する報告はほとんどなく、いまだ未解明な部分が多い。そこで、本研究では実環境中における MV 生産およびその役割を明らかにすることを目的とした。微生物が多く存在する環境として活性汚泥を材料とし、MV 生産菌の同定および MV 受容菌の探索を行った。細胞外に放出された膜脂質を定量し、TEM によって微細構造を観察したところ、活性汚泥サンプルから MV 様粒子が同定された。活性汚泥中には MV 産生菌が存在することが示唆された。さらに、この MV 様粒子が微生物由来かどうか、生物マーカー等を持って検証していく。また、単離株から分離した MV を蛍光染色し、活性汚泥サンプルに添加することで、MV 受容菌の探索も行っている。MV 供与菌としては、活性汚泥からの単離株である *Paracoccus* 属細菌を用いた。本細菌は活性汚泥から多く単離され、先行研究において MV 生産や同種菌への MV の付着が確認されている。今後、活性汚泥中の MV 生産菌と受容菌の関係を明らかにしていくことで、MV を介した微生物間ネットワークの解明および複合微生物系理解へと繋がることが期待される。



## P-023

### Protein aggregation and aging in fission yeast

○Hidenori Nakaoka, Yuichi Wakamoto

Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo

E-mail: hidenori\_nakaoka@cell.c.u-tokyo.ac.jp

Although replicative aging has been clearly demonstrated in asymmetrically dividing unicellular organisms, it has been controversial if symmetrically dividing microbes age or not. Based on large-scale single-cell lineage data obtained by time-lapse microscopy with a microfluidic device, we have extensively demonstrated the absence of replicative aging in the old-pole cell lineages of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* in favorable conditions. Here, we observed how Hsp104-associated protein aggregates, one of the potential aging factors, formed and accumulated in those aging-free lineages, and examined its relation to cellular growth and death. Cells cultured in rich medium contained zero or one major Hsp104-GFP focus. Once formed, the protein aggregates tended to remain at the old-poles for several generations, but eventually cleared upon cell division. The distribution of the clearance time was roughly approximated by an exponential distribution, suggesting randomness of the clearance events. Neither the aggregation level nor aggregation age did not correlate with generation time, indicating that the presence of protein aggregates per se does not affect cellular growth. Although protein aggregates quickly accumulated just before death, the aggregation level failed to predict the onset of the dying process. These results suggest that Hsp104-associated protein aggregates are not “aging factor” in fission yeast.

## P-024

## NRP がロドコッカス属細菌の集団形態を制御する

○茂木 亮介<sup>1</sup>, 長田 啓司<sup>1</sup>, 稲葉 知大<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>3</sup>, 豊福 雅典<sup>3</sup>, 野村 暢彦<sup>3</sup><sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>産総研・環境管理, <sup>3</sup>筑波大・生命環境系

実環境中において、いくつかの微生物は凝集体と呼ばれる集団形態で生息している。凝集体は微生物が自己凝集して形成される構造体であり、液中に浮遊・沈殿した状態で存在する。凝集体形成による菌体の沈降は固液分離プロセスに利用されるため、凝集体形成は発酵や排水処理などの微生物を用いた産業において重要である。しかし凝集体形成の分子メカニズムには未解明な点が多く、その制御は現在においても容易ではない。

当研究室で単離された放線菌 *Rhodococcus* sp. SD-74 は、液体培地中で粒径が数 mm にも及ぶ凝集体を形成する。SD-74 株の凝集体形態は、粒径数十  $\mu$  m の微小な凝集体の形成、微小な凝集体の集合による凝集体の発達、崩壊による細分化というステージを有している。我々は、ランダムに遺伝子が破壊されたトランスポゾンライブラリー中から、長期培養後も凝集体が崩壊しないトランスポゾン変異株を見出した。この変異株は Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) をコードする遺伝子が破壊されており、本 NRPS 遺伝子のインフレーム破壊株においても凝集体の崩壊は見られなかった。NRPS 遺伝子の発現量解析により、凝集体崩壊後の NRPS 遺伝子発現量は凝集体崩壊前に比べて増大しており、凝集体崩壊時にその発現が誘導されていることが示唆された。一般に NRPS は Nonribosomal peptide (NRP) と総称されるペプチドを産生するため、本 NRPS によって産生される NRP が凝集体の崩壊に必須であると考えられる。SD-74 株は秩序だった凝集体形態を有するために自律的な凝集体形態制御が存在することが予想されたが、本研究は NRP がその一因子であることを強く示唆している。このことは、多くの産業用途に利用されている放線菌の凝集体形態制御因子にも重要な知見を与え、微生物産業に大きく資する可能性を示している。

## P-025

## 細胞間情報伝達機構を介した集団化回避メカニズムの解明

○森永 花菜<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>2</sup><sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系

E-mail: cocoawayappari76@gmail.com

我々が言葉を介して会話を行うように、細菌同士もシグナル物質を介して情報伝達を行う。このシグナルを介した情報伝達機構では、制御下の遺伝子の転写量を変動させることで、様々な形質を変化させる。環境中では、シグナルの合成遺伝子のホモログを保持する細菌が多く存在することが報告されている。さらには、我々の研究室では、それらの遺伝子によって合成されるシグナル様の低分子化合物が、排水処理に用いられる微生物の凝集体である活性汚泥に存在することをメタボローム解析によって明らかにしている。これらのことより、環境中では多くの細菌が情報伝達をしながら生存していると考えられ、微生物生態を考える上で細胞間の情報伝達機構を理解することは、大変重要な意味をなす。そこで本研究では、環境中の細菌の情報伝達機構、さらにはその情報伝達が環境中でどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。

本研究では、活性汚泥から頻繁に単離されるシグナル生産菌の一種である *Paracoccus denitrificans* を用いて解析を行った。*P. denitrificans* はシグナルとして炭素鎖 C16 の AHL (C16-HSL) を生産するが、その制御下の遺伝子群や形質に関しては未解明である。そこで、*P. denitrificans* において C16-HSL 非生産株 ( $\Delta luxI$ ) を作製し、RNA-seq によって網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、 $\Delta luxI$  では WT より転写量が上昇する遺伝子が 288 個、減少する遺伝子が 134 個存在することが明らかとなった。このことより、*P. denitrificans* においてもシグナルを介した情報伝達機によって遺伝子発現が調節されることが示唆された。さらに、興味深いことに  $\Delta luxI$  は液体培養中で WT では観察されないような強凝集性を示すことが明らかとなった。また、 $\Delta luxI$  に C16-HSL を添加すると凝集体が形成されないことより、*P. denitrificans* は C16-HSL を介して凝集体形成を抑制していることが示唆された。つまり、C16-HSL を介した情報伝達により、集団であることを認識することで、集団化 (凝集体形成) を回避していることが考えられる。今後は、*P. denitrificans* における情報伝達を介した凝集体抑制メカニズムの詳細な解析及び本行動の環境中での役割の解明を目指す。

## P-026

## 菌体密度が微生物間相互作用に与える影響の解析

○勝亦 雄太, 豊福 雅典, 小川 和義, 野村 暢彦

筑波大院・生命環境

微生物の生息域は幅広い。河川・湖・海洋といった水圏，砂漠・土壌などの地圏から，動植物の体内にまで至る。孤立無援に存在すると考えられていたこれら微生物は，実は多くが集団を形成し，互いに関わり合いを持つこと(微生物間相互作用)が明らかになりつつある。例えば Quorum Sensing (QS) という微生物間相互作用は，微生物の呼吸，病原性，抗生物質耐性，運動性といった様々な性質を変化させており，実環境中における微生物の生態を理解する上で重要である。QSは微生物間で低分子化合物(シグナル物質)を受け渡すことで機能を発現するため，菌体密度依存的な機構だと思われる。菌体間距離が近づくほどシグナル物質の受け渡しが発現になり，発現が誘導されると考えられるためである。しかし，実際に菌体密度を制御し微生物の挙動を解析した例はほとんどない。そこで本研究では，菌体密度が微生物間相互作用に与える影響の解析を行った。菌体密度を制御する素材として，温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA) に着目した。PNIPAは32℃を境に伸縮する性質を持つため，微生物を包括させたPNIPA担体に温度変化を与えることで菌体密度を制御できると考えた。まず，QSモデル細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (野生株) を包括したPNIPA担体を異なる温度条件で培養し，包括菌体の増殖挙動を観察した。結果，収縮したPNIPA担体では特異的に菌体数が増加することが分かった。この挙動にQSが関与するか確かめるため，続いて  $\Delta lasI \Delta rhII$  (シグナル物質非生産株) を用い同様の実験を行った。結果，シグナル物質非生産株では野生株に見られた菌体数の増加は確認されなかった。また，体積変化を伴わない担体においては，野生株，シグナル物質非生産株のいずれにおいても菌体数の増加は観察されなかった。以上の結果から，収縮したPNIPA担体が作り出す高い菌体密度条件が，*P. aeruginosa* のQS発現を誘導する効果を持つことが示唆された。本研究により，菌体密度に応じて微生物のQS発現が制御されることが示唆された。

## P-027

## 硫黄源が関与する枯草菌の寒天培地上のシアノバクテリアの増殖誘導能

○林 昌平, 竹村 萌香, 井藤 和人, 巢山 弘介

島根大・生資

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

【背景と目的】シアノバクテリア *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 株は、有機物含有培地である 1/10PTYG 寒天培地上では増殖しないが、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 が共存すると増殖する。*B. subtilis* 168 が 1405/1 株に増殖必須因子を供給していると予想された。その因子を特定するために *B. subtilis* 168 の遺伝子欠損ライブラリーから 1405/1 株の増殖誘導能を欠損した株を同定した。その中に *yvgQ*、*yvgR* 欠損株があり、これらの遺伝子はシステイン生合成経路において亜硫酸を硫化物に還元する酵素をコードすると推定されている。そこで寒天培地にシステインを添加すると、欠損株の増殖誘導能が相補されたが、システイン添加のみでは 1405/1 株の増殖は誘導されなかった。また、大腸菌のシステイン生合成経路には硫酸塩またはチオ硫酸塩を初発基質にする 2 つの経路があることが知られている。そこで本研究では、*B. subtilis* 168 が寒天培地上で 1405/1 株を増殖させる能力に関与するシステイン生合成経路と *B. subtilis* 168 が供給する増殖必須因子を解明するために実験を行った。

【方法】システイン生合成に関与すると推定される種々の硫黄含有物（チオ硫酸 Na、硫酸 Na、亜硫酸 Na、硫化 Na、システイン）を添加した 1/10PTYG 寒天培地上で、1405/1 株を単独培養、または *B. subtilis* 168、*yvgQ* 欠損株、*yvgR* 欠損株と共培養し、1405/1 株の増殖を調査した。

【結果と考察】チオ硫酸 Na を添加すると 1405/1 株が単独で増殖することから寒天培地上ではチオ硫酸塩を初発基質にシステインを生合成して増殖すると予想した。*yvgQR* 欠損株が 1405/1 株の増殖誘導能を失ったこと、硫化 Na 添加によって 1405/1 株が単独で増殖したが硫酸 Na 添加によっては増殖しなかったことから、1405/1 株は硫酸塩を初発基質にシステインを生合成する経路中の亜硫酸を硫化物に還元する反応が阻害されているために寒天培地上で増殖できず、*B. subtilis* 168 は硫化物以降の化合物を 1405/1 株に供給することで寒天培地上での 1405/1 株の増殖を誘導していると考えられる。興味深いことに、チオ硫酸 Na を添加しても *yvgQR* 欠損株が共存すると、また、硫化 Na を添加しても枯草菌が共存すると 1405/1 株はほとんど増殖しなかった。これらのことからチオ硫酸 Na か硫化 Na が存在すると枯草菌の増殖誘導能が抑制されると考えられる。



## P-028

### 競争条件下における異属微生物の共存機構解明

○鈴木 研志<sup>1</sup>, 本荘 雅弘<sup>2</sup>, Fatma Azwani<sup>3</sup>, 斉藤 保久<sup>4</sup>, 田代 陽介<sup>2</sup>, 二又 裕之<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>静大・創造, <sup>2</sup>静大・院工, <sup>3</sup>Univ. Putra Malaysia, <sup>4</sup>島根大・総, <sup>5</sup>静大・グリーン研

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

地球上の様々な環境において、微生物は相互関係を築くことで微生物生態系を構築している。微生物生態系は内外の環境変化に対応するため、その群集構造を柔軟に変化させつつ生態系としての機能を維持している。しかし生態系における群集構造変遷および機能維持機構は未だ概念の域を超えておらず、その解明が希求されている。環境中では利用できる基質に限りがあり、存在する微生物間で基質を巡る競争が起きていると考えられる。Lotka-Volterra 競争理論によれば、単一基質を巡る競争系では最も競争力の高い微生物が優占化し、他の微生物は淘汰されてしまう。一方で、土壌を接種源としフェノールを唯一の炭素源とする連続集積培養系では、群集構造および機能の変遷が収束した培養後期においても様々な微生物種の共存が確認されている。この競争理論のみでは説明することができない共存を解明することは、微生物生態系の持つ機能的恒常性と環境変化に対する群集構造の柔軟性の理解につながると考えられる。そこで本研究では競争条件下における種の共存機構の解明を目的とし、上記集積培養系より単離された *Pseudomonas* sp. LAB-08 株、*Ralstonia* sp. P-10 株および *Comamonas testosteroni* R2 株の三菌株を用いて、フェノールを唯一の炭素源とする二菌株混合培養系を構築し動態解析を行った。その結果全ての培養系において二菌株の共存が確認された。興味深いことに、フェノールおよびカテコールに対する動力学的解析の結果、P-10 株および R2 株混合培養系において、P-10 株がフェノールを分解し、代謝産物であるカテコールを R2 株が分解あるいは二菌株で共有している様が観察された。そこで、フェノールが P-10 株によってカテコールに変換され、カテコールが両株によって分解されるモデルを構築し解析を行った。その結果、カテコールの共有率に依存しないで共存することが数学的に否定された。即ち、P-10 株および R2 株の共存を可能とするカテコール共有率の範囲が存在することが示唆された。以上のことから、競争条件下にあるにも関わらず両菌株の共存が可能なのは、菌株間の相互作用によって互いの代謝が精巧に制御されているからであると考えられた。また、基質あるいは代謝産物の共有率の幅が微生物生態系における柔軟性であり、その範囲における代謝バランスの揺らぎが群集構造変遷として捉えられていると推察された。

## P-029

## クローナルな硝化菌集団における細胞増殖活性の不均一性の評価と機構解明

○一色 理乃<sup>1</sup>, 藤谷 拓嗣<sup>1,2</sup>, 田中 大器<sup>2</sup>, 関口 哲志<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>早大 院先進理工, <sup>2</sup>早大 ナノ・ライフ創新研究機構

E-mail: isshiki-ryrs@fuji.waseda.jp

【目的】硝化菌は、自然環境中での窒素循環や排水処理場での生物学的窒素除去プロセスにおいて重要な役割を担っている。しかし、増殖機構などの生理学的性質は明らかになっておらず、増殖を人為的に制御することができない。クローナルな細胞集団を同じ環境で培養したとしても、個々の細胞の増殖活性は常に等しいとは限らず、シングルセルレベルで表現型にばらつきが存在することが考えられる。本研究では、クローナルな硝化菌集団を対象として、シングルセルレベルでの増殖速度を解析することで、硝化菌の増殖機構を理解することを目的とした。

【方法】対象とする純菌株は、本研究室で独自に単離し所持しているアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas mobilis* Ms1、亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* sp. ND1、*Nitrospira japonica* NJ1 とした。各株を固体培地上に播種してからコロニーが出現するまでの時間とコロニーが拡大していく時間を測定した。さらに、マイクロ流体デバイス中で液体培地を流し、各株を生きたままシングルセルレベルで観察し、分裂の様子を直接観察した。

【結果・考察】固体培地上でのコロニー形成は、Ms1 と NJ1 で確認できた。どちらの株でも、各コロニーが肉眼で見えるようになるまでの日数にばらつきが見られた。また、出現したコロニーには徐々に拡大していくものと大きさの変わらないものが存在した。この結果から、Ms1 と NJ1 では、コロニーを形成する際に、増殖が活発になるまでの期間や増殖が停止するまでの期間にばらつきがあることが明らかになった。また、マイクロ流体デバイスでの観察では Ms1 と ND1 で増殖が観察された。Ms1 で増殖の速い細胞は一細胞が単体で存在するシングルセル状態、増殖の遅い細胞は複数の細胞が凝集して形成されるマイクロコロニー状態で存在していた。一方、ND1 では、増殖の速い細胞はマイクロコロニー状態、増殖の遅い細胞はシングルセル状態で存在していた。したがって、Ms1 と ND1 ではシングルセルレベルで増殖速度にばらつきが存在し、この不均一性は属レベルで異なることが明らかになった。以上より、クローナルな硝化菌集団において、個々の細胞の増殖速度に不均一性が存在することが判明した。今後は、増殖活性の不均一性を生み出す遺伝子と環境因子を解明し、硝化菌の増殖を制御する方法を確立することを目指す。



## P-030

## 抗菌材表面に形成されるバイオフィルム —初期の性状変動—

○安田 怜子<sup>1</sup>, 大和 優作<sup>2</sup>, 土屋 雄揮<sup>2</sup>, 江田 志磨<sup>2</sup>, 森崎 久雄<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>立命大・院生命, <sup>2</sup>立命大・生命

E-mail: sb0024fp@ed.ritsumei.ac.jp

抗菌とは、「細菌の増殖を抑制すること」と定義されている。この抗菌効果をもつ材料である「抗菌材」は、近年、身の回りの様々なところ（台所シンクや工場のタンク等）で使用されている。

抗菌材の効果については、これまで実験室レベル（単一菌株、短期間）の実験で評価されてきた。そのため、実際に抗菌材を使用する現場で抗菌材がどのような効果を発揮するかは明らかでなかった。我々はこれまで、様々な現場環境（屋内や屋外）で抗菌材を使用し、その効果を調べてきた。その結果、抗菌材表面にバイオフィルム（微生物の共同体）が形成されることを見出した。長期間（1～5年間）使用した抗菌材表面には、非抗菌材表面と同程度かつ、類似した性質（菌数や細菌群集構造）のバイオフィルムが形成されていた。一方、短期間（1週間～3ヶ月間）の使用では、抗菌材表面で菌数が抑制される傾向が見られた。ただし、1週間目の時点で、すでに、抗菌材表面に多くの菌が見られたため、より期間を短くして調べる必要が生じた。そこで、本研究では、形成ごく初期（1日～1週間）における、バイオフィルムの性状および抗菌材の影響を明らかにすることを目的とした。

屋内（台所のシンク）および屋外（自然池）に基質（抗菌材および非抗菌材）を1週間設置した。それら基質表面を定期的（設置後1, 3, 5, 7日目）に顕微鏡で観察し、菌数、酸性ムコ多糖量を測定した。屋内では、設置後1日目から両基質表面で菌以外の付着物が確認された。ただし、付着物の量は、抗菌材表面の方が高い傾向にあった。一方、菌数は、両基質ともに設置後1日目から経時的に増加し、設置後5日目以降に著しく増加していた。その著しい増加と共に、菌が密集している部分が増え、抗菌材表面で非抗菌材表面よりも菌数が少なくなる傾向も見られるようになった。また、酸性ムコ多糖は、期間中、ほとんど検出されなかった。以上の結果から、抗菌材表面には数日のうちに菌が付着し、付着した菌が増殖するときに、その増殖を抗菌材が抑制する可能性がある。屋外では、設置後1日目から屋内よりも多くの付着物が付着している様子を確認している。発表では、屋外も含めて形成ごく初期のバイオフィルムの性状と抗菌効果について議論する。

今後は、バイオフィルム内の細菌の群集構造、活性などを調べ、バイオフィルムへの抗菌材の影響の詳細を明らかにする予定である。

## P-031

## 環境中のキノロン自然耐性菌／感受性菌についての考察

○馬場 理<sup>1</sup>, 佐々木 崇<sup>2</sup>, 森本 ゆふ<sup>1</sup>, 杉山 遙夏<sup>3</sup><sup>1</sup>順天堂大学医学研究科 感染制御科学研究センター, <sup>2</sup>順天堂大学医学部 微生物学, <sup>3</sup>順天堂大学医学部 (学部学生)

E-mail: tbaba@juntendo.ac.jp

放線菌が産生する抗生物質ナイボマイシン (NYB) や植物フラボンの一種アピジェニン (API) は、キノロン系抗菌薬耐性菌の生育を抑制するが、キノロン感受性菌には奏功しないという特異的な性質を示す。キノロン耐性の多くは、この薬剤が標的とする細菌 Type IIA DNA topoisomerase のキノロン耐性決定部位 (QRDR) に起きる点変異によってもたらされるが、NYB や API 存在下で同薬剤の耐性菌を選択すると、QRDR のアミノ酸配列がキノロン感受性の野生型に「復帰」し、それに伴い MIC 値もキノロン感受性を示す。我々は、キノロン系抗菌薬と相補的な機能を示す、このような全く新しい性質を持つものを「復帰抗生物質」と名付けて報告し、キノロン耐性菌による感染症治療困難を克服する切り札と期待している。ところで臨床家は、「人類がキノロンを臨床導入して以来、キノロン耐性菌が蔓延した」と考えがちだが、これは事実だろうか？キノロンは人工抗菌薬であり、一方の復帰抗生物質は天然物であることを踏まえつつ、自然界にキノロン感受性菌（≡復帰抗生物質耐性菌）が圧倒的に多いと仮定すれば、復帰抗生物質の存在は不要のものになってしまう。そこで、「自然界にはキノロン感受性菌が多い」という前提それ自体に誤りがあるのではないか？と思い至り、種々条件下の環境菌を集め、キノロン耐性菌と API 耐性菌をそれぞれ寒天培地上で選択し、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA 配列に基づく細菌叢のクラスター解析を行った。その結果、予想通り、多様なキノロン耐性菌が広範囲に見いだされた。さらに、分離された細菌が属する分類上の特定の目（もく）にキノロン耐性／API 耐性の科が両方混在しているのではなく、むしろキノロン耐性の目と API 耐性の目とが明確に区分できることを見いだした。また、キノロン耐性（≡復帰抗生物質感受性）の目にはヒトに病原性を持つ菌種がほとんど含まれない一方、API 耐性菌にはそれが含まれることが分かった。以上の結果は、復帰抗生物質が細菌の分化を誘導した可能性があること、さらに、従来キノロンが臨床で奏功していたのは、ヒトに病原性をもつ菌のほとんどがたまたまキノロン感受性だったからに過ぎず、進化の過程で感受性菌のみが選択的に病原性を持つに至ったことを示唆している。

## P-032

### 難培養性微生物 *Nitrospira* の増殖促進、休眠・覚醒現象の解明

○村上 千穂<sup>1</sup>, 金田一 智規<sup>1</sup>, 大橋 晶良<sup>1</sup>, 青井 議輝<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大・院工, <sup>2</sup>広島大・サステナセンター

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、微生物間相互作用および休眠・覚醒の観点から解明することを目的とした。*Nitrospira* は実際の環境中では自身の代謝産物を基質として増殖する従属栄養細菌と共存している。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たところ、実際に複数の菌種は *Nitrospira* の増殖を促進する活性を保持していた。一方で、*Nitrospira* は自身の活性を阻害する物質を産出している現象を同時に確認できたことから、環境中では増殖阻害物質を共存する従属栄養細菌が分解・除去することで *Nitrospira* の増殖を促進していると考えられる。つまり、通常の見分培養条件（回分培養）では阻害物質が蓄積するため *Nitrospira* の培養を困難にしているのではないかと考えられた。また、*Nitrospira* は特定の条件で休眠状態に容易に陥り、特定の条件で覚醒することが判明し、さらに休眠状態の *Nitrospira* を覚醒させる未知因子の存在が示唆された。

## P-033

# 緑膿菌における地理的分布と Quorum sensing システムとの関連

○遠矢 正城<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>1</sup>, 木暮 一啓<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>筑波大・生命環境系, <sup>2</sup>東京大・大気海洋研

E-mail: s1521102@u.tsukuba.ac.jp

微生物は地球上のいたるところに存在し、様々な機能を発揮し環境適応している。近年では微生物同士がお互いにコミュニケーションをとりあうことで集団的な挙動を示し環境適応することもわかってきている。コミュニケーション機構の一つであるクオラムセンシング (Quorum sensing, QS) はシグナル物質を介し一定の菌密度になったことを感知し、様々な遺伝子の転写活性を調節する機構である。緑膿菌は QS によって病原性因子の放出やバイオフィーム形成を行うなど宿主内で集団的な様態を示し、抗生物質に対して物理的・化学的に耐性を獲得することから医療面で問題視されてきた日和見感染菌である。さらに緑膿菌はヒト体内だけでなく、土壌や河川などの自然環境中にも広範囲に分布しており、近年では貧栄養・高塩分濃度という極限的な外洋中からも単離が報告されている。従って、緑膿菌は非常に高い環境適応能力を有していると考えられる。宿主体内において QS が重要な役割を果たしている一方で、自然環境下での環境適応に QS がどのように寄与するのかといったことは明らかになっておらず興味深い点として挙がる。本研究においては河川・湖・海洋といった水環境から採取された緑膿菌株を対象にし、地理的分布と QS システムの多様性との関連を検証した。具体的には、それら緑膿菌株の QS 制御下にある病原性色素ピオシアニン及び、QS シグナル (3-oxo-C12-HSL, C4-HSL, PQS) の生産量の比較を行った。その結果、河川や沿岸分離株はピオシアニン生産や QS シグナルの生産が顕著であり、外洋分離株ではそれらの生産量が PAO1 と比較して大きく減少する傾向が示された。また外洋分離株に対し外部シグナルへの応答性を確認したところ、株によって異なる応答性を示した。さらに QS 関連遺伝子の配列を解読し、アミノ酸配列を比較した結果、シグナルのレセプタータンパクやシグナル生合成酵素のアミノ酸配列が PAO1 と比べて異なっていることもわかった。以上の結果から緑膿菌の地理的分布と QS システムには相関があることがわかり、異なる環境下においてコミュニケーション方法を巧みに変化させることでよりその環境に適応していると考えられる。



## P-034

## う蝕病原性細菌におけるスクロース依存的な細胞外DNA放出機構の解析

○井上 紗智<sup>1</sup>, 稲葉 知大<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>3</sup>, 八幡 穰<sup>4</sup>, 泉福 英信<sup>5</sup>, 野村 暢彦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>筑波大・生物資源科学, <sup>2</sup>産総研・環境管理, <sup>3</sup>筑波大・生命環境系,

<sup>4</sup>Department of Civil, Environmental and Geomatic Engineering, Institute for Environmental Engineering, ETH Zurich,

<sup>5</sup>感染研・細菌第一部

う蝕(虫歯)は、85%以上の日本人が経験したことのある最も身近な感染症の一つである。う蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* が砂糖の主成分であるスクロースを基質として不溶性グルカンを合成し、歯表面に強固なバイオフィーム (BF) を形成することでう蝕が発症することが知られる。我々の研究グループは、スクロースが不溶性グルカン産生に必要なのみならず、細胞外DNA (eDNA) の放出を誘導することを発見した。さらに、eDNAはBFの骨格として機能し、BF構造を物理的に補強することを明らかにしてきた。しかし、その放出機構は不明のままであり、本研究では *S. mutans* におけるスクロース依存的なeDNA放出機構の解明を目的とし研究を行った。スクロースにより放出されるeDNAの由来を検証するため、eDNAをテンプレートにゲノム上のそれぞれ離れた場所に位置する4遺伝子をPCR増幅した。その結果、すべての遺伝子において増幅が確認され、放出されたeDNAはゲノムDNAの広範囲の領域を含むことが示唆された。またeDNA放出に関与する遺伝子群の特定のため、RNA-seqを用いた網羅的な転写産物解析を行った。スクロースにより多くの遺伝子の転写産物量変動が確認され、さらにその遺伝子群には酸耐性制御に関連する遺伝子が複数含まれていた。*S. mutans*は乳酸発酵により周囲の環境を酸性化することが知られており、eDNA放出と酸耐性との関連が疑われた。そこで酸耐性試験を試みた結果、スクロース存在下では非存在下と比較して酸耐性の低下が認められた。また、培地に緩衝作用を持たせたところスクロースによるeDNA量の増加は見られなかった。つまりスクロースにより、乳酸発酵による酸性化と同時に *S. mutans* の酸耐性が低下することがeDNA放出の原因であると示唆された。以上の結果より、スクロースによりBF中の一部の細胞に酸ストレスによる細胞死が引き起こされ、死細胞のゲノムDNAに由来したeDNAが放出される可能性が考えられた。このようなスクロース依存的なeDNA放出誘導は、集団の一部の個体が自身を犠牲にし、バイオフィームの物理的な構造強化を導く利他的な行動といえる。この行動は唾液の流れが激しい口腔内において、細菌が定着するための重要な集団生存戦略だと考えられる。

## P-035

Quorum-sensing 機構による亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira japonica* の  
活性制御メカニズム

牛木 章友<sup>1</sup>, ○島田 侑<sup>1</sup>, 藤谷 拓嗣<sup>1</sup>, 諸星 知広<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早大院・生医, <sup>2</sup>宇大院・工

【背景】亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* は亜硝酸を硝酸に酸化することでエネルギーを獲得する独立栄養性細菌であり、生態系における窒素循環の一角を担っている。しかしながら、*Nitrospira* は分離培養が困難であるため、その性質の多くが謎に包まれている。これまでに我々の研究チームでは *Nitrospira japonica* NJ1 株の分離培養に成功し、ゲノム配列の解読を完了している。その結果、*N. japonica* NJ1 株はアシル化ホモセリンラクトン (AHL) 合成遺伝子と AHL 受容体遺伝子を保持しており、これまでに *Nitrospira* 属では報告のない Quorum-sensing (QS) 機構により微生物活性を制御している可能性が示唆された。そこで本研究では、QS 機構による *N. japonica* NJ1 株の遺伝子発現制御を調査し、亜硝酸酸化活性に対する制御機構の解明を目的とする。

【方法】菌体密度と QS 機構関連遺伝子の関係性を調査するために、*N. japonica* NJ1 株を亜硝酸含有無機培地で 12 日間振とう培養し、細菌数、QS 機構関連遺伝子の発現量の変化を測定した。また、*N. japonica* NJ1 株から DNA を抽出し、AHL 合成遺伝子を PCR で増幅後、大腸菌 *E. coli* JM109 株に形質転換した。つづいて、形質転換した *E. coli* JM109 株を LB 培地で一晩振とう培養し、培養上清を孔径 0.22  $\mu$  m の滅菌フィルターで処理後、LC-MS により同定を試みた。さらに、上記の上清サンプルを *N. japonica* NJ1 株に添加後、数日間振とう培養し、亜硝酸酸化活性の評価、亜硝酸酸化還元酵素をコードする *nxrA* 遺伝子の発現量を測定した。

【結果】12 日間の培養試験の結果、細菌数の増加に伴い QS 機構関連遺伝子の発現量が増加することが確認された。また、形質転換した *E. coli* JM109 株の培養上清を LC-MS により同定した結果、上清中には 5 種類の AHL が分泌されていることが明らかになった。さらに、上記の上清サンプルを *N. japonica* NJ1 株に添加した結果、亜硝酸酸化活性が向上し、一部の *nxrA* 遺伝子の発現が誘導されていることが明らかになった。したがって、*N. japonica* NJ1 株は QS 機構により、細菌数に依存した亜硝酸酸化活性制御を行うという新たな知見が見出された。

## P-036

### **Divergence of the biofilm architecture, component and microbiome involved in the fouling of membrane bioreactors**

○Tomohiro Inaba, Tomoyuki Hori, Ronald Navarro, Hidenobu Aizawa, Atsushi Ogata, Hiroshi Habe

Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

In nature, microbes form complexes called biofilms that comprise cells and extracellular matrixes. In membrane bioreactors (MBRs) for wastewater treatment and reclamation, biofilm formation on the filtration membrane and the subsequent clogging of membrane pores (called biofouling) is one of the most persistent problems. In this regard, sodium hypochlorite (NaOCl) has been generally used to wash clogged membranes for recovery and maintenance purposes. Here, we investigated the structure and microbiome of biofilms formed on filtration membrane in the MBR under several different conditions. The biofilm structure was investigated using non-destructive confocal reflection microscopy (CRM) and high-throughput sequencing of 16S rRNA genes. Direct CRM indicated that the biofilms maintained a state of thinness regardless of the increasing transmembrane pressure (TMP) at low organic loading rates (OLRs). Their components were primarily extracellular polysaccharides and microbial cells. In contrast, high OLRs resulted in a rapid increase in the TMP and the development of thick biofilms mainly composed of extracellular lipids. High-throughput sequencing revealed that the biofilm microbiomes, substantially changed in response to the OLR conditions and biofilm development. Secondary, to evaluate the influence of NaOCl treatment on clogged membranes with biofilm formation, an attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FT-IR) spectrometer analysis was performed. ATR-FT-IR indicated the disappearance of functional groups representing different membrane fouling compounds after treatment with NaOCl. However, the high-throughput sequencing revealed the presence of residual halotolerant bacteria even after treatment with NaOCl. These results demonstrated that the architectures, chemical components and microbiomes of the biofilms on fouled membranes were highly diverse, and the formation of biofilms made it difficult to remove the biofouling completely.



## P-037

## バイオフィルム間隙水中での微生物の増殖

○浅田 智也<sup>1</sup>, 中尾 春香<sup>2</sup>, 土屋 雄揮<sup>2</sup>, 江田 志磨<sup>2</sup>, 森崎 久雄<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>立命大・院生命, <sup>2</sup>立命大・生命

E-mail: sb0016ii@ed.ritsumei.ac.jp

バイオフィルム内のポリマー間隙の殆ど（約90%以上）は水（以下、間隙水と呼ぶ）で占められている。これまでに我々は、1）この間隙水中に、周辺の水中に比べ数百倍以上の高濃度の栄養成分（有機物、栄養塩）が含まれていること、2）それらがバイオフィルム内の微生物の増殖やEPS生産に利用され得ることを明らかにしてきた。しかし、栄養成分がバイオフィルム内で一様に同じ濃度、組成で存在しているとは限らない。そこで本研究では、間隙水中の栄養成分の濃度や組成が異なった場合、微生物の増殖やEPS生産にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。そのため、様々な濃度の間隙水や、間隙水と栄養成分の濃度・組成の異なる培地（湖水やNB）を用い、バイオフィルム由来の微生物を培養した。

2016年7月5日に琵琶湖赤野井湾で、湖水中の石とその周辺の湖水を採取した。石表面のバイオフィルムを滅菌蒸留水に懸濁し、ろ過滅菌することで間隙水培地（原液の5倍希釈相当）とした。これをさらに希釈し、50倍、500倍希釈の間隙水培地も作製した。各々の培地に少量のバイオフィルム懸濁液（接種源）を加え、それぞれ48時間培養した（25℃、150 rpm）。経時的に培養液を分取し、菌数測定、細菌群集構造解析を行った。なお、湖水を用いて作製した湖水培地（原液、5倍濃縮、10倍濃縮）、およびNB培地でも同様に培養実験を行った。

5倍希釈および50倍希釈の間隙水培地では、経時的に菌数が増加し、接種源と比べ細菌群集構造が大きく変化した。また、培養終了時の双方の間隙水培地では、それぞれ10種以上の細菌が検出され、その内、両方で共通していたのは4種だけだった。間隙水中の栄養成分の濃度により、接種源中の増殖可能な細菌の種類が変化すると考えられた。500倍希釈した間隙水培地および湖水培地（原液、5倍濃縮、10倍濃縮）では、菌数が殆ど増加せず、培養終了時の群集構造は接種源と似通っていた。栄養成分の濃度が低いため、細菌が生残していただけなのかもしれない。

以上のことから、間隙水中の栄養成分の濃度が、微生物の増殖が可能かどうか、さらには増殖できる菌の種類に関わっていることが解った。発表では、間隙水中の栄養成分の濃度に加え、組成が異なった場合の微生物の増殖やEPS生産、栄養成分の経時変化の結果も報告し、バイオフィルム間隙水中の栄養成分の存在様式について議論する。

## P-038

### 湿地から分離した新規硫酸還元細菌 NAW-5 株の諸特性と グラム陽性硫酸還元細菌群の再分類の検討

○渡邊 美穂, 小島 久弥, 福井 学

北海道大・低温研

E-mail: m.watanabe@pop.lowtem.hokudai.ac.jp

*Desulfotomaculum* 属は、グラム陽性孢子形成性の硫酸還元細菌の一群である。この属は系統的多様性が非常に高いために、これに含まれる 35 種は 8 つの下位分類群 (*Desulfotomaculum* サブクラスター Ia ~ Ih) に分けられている。この下位分類群の中には *Cryptanaerobacter*, *Desulfurispora*, *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum* の 4 属も混在しており、その中には硫酸還元を行わないものも含まれる。本研究は、*Desulfotomaculum* 属の新規細菌 NAW-5 株の諸特性を明らかにするとともに、*Desulfotomaculum* 属の下位分類群の系統的位置について検討することを目的とした。NAW-5 株は湿地帯土壌より得られた。NAW-5 株の細胞は幅約 1  $\mu$  m、長さ 5-10  $\mu$  m ほどのらせん状で、70-80  $\mu$  m 程の長さになるものもあった。細胞は運動性を有しており、グラム染色性は陰性であった。硫酸塩の存在下で、さまざまな有機酸類を炭素源及びエネルギー源として利用した。酢酸・イーストエキスの存在下で、硫酸塩、チオ硫酸塩、単体硫黄を電子受容体として利用した。発酵条件下では、ピルビン酸、フマル酸、安息香酸を用いて増殖した。増殖の最適温度は 32-37°C で、ゲノム DNA の G+C 含量は 46.6% であった。16S rRNA 遺伝子配列の解析では、NAW-5 株は *Desulfotomaculum* 属、*Pelotomaculum* 属、*Cryptanaerobacter* 属の様々な種との間に 90% ほどの配列相同性を有していることが示された。系統樹上では、NAW-5 株は *Desulfotomaculum* サブクラスター Ig に属することが示された。近隣の分類群との関係性などから、NAW-5 株についてはこれを唯一の種とする新属を設けるのが適切であると考えられた。また、これまでの分類学的研究によって *Desulfotomaculum* 属の個々のサブクラスターはそれぞれが属レベルの独立性を有することがすでに示されている。そのため、*Desulfotomaculum* 属のそれぞれのサブクラスターに対応する新たな属を設けて、大規模な再分類を行うことを提唱する。

## P-039

# ゲノム上に GC 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性アーキアの温度適応

○佐藤 悠<sup>1</sup>, 藤原 健智<sup>1</sup>, 木村 浩之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>静岡大・創造院, <sup>2</sup>静岡大・グリーン研

E-mail: sato.yuh.15b@shizuoka.ac.jp

多くの原核生物はゲノム上に複数コピーの 16S rRNA 遺伝子を有するが、それらの塩基配列に差はない。そのため、16S rRNA 遺伝子は原核生物の系統解析に用いられてきた。一方、近年の全ゲノム解読によりゲノム上に塩基配列の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を有する原核生物が報告されている。特に、好塩性アーキア *Haloarcula* 属菌株は、ゲノム上に塩基配列では 5%、GC 含量では 2% の違いがみられる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を有する。しかし、それらの生理生態学的重要性については明らかにされていない。16S rRNA は二次構造を形成し、タンパク質合成の翻訳機能を担うリボソームの一部として機能する。二次構造を形成する塩基対のうち、グアニンとシトシン間で水素結合数が最も多い。そのため、16S rRNA の GC 含量が高いほど、高温条件下でも二次構造は安定するとされている。実際に、16S rRNA 遺伝子の GC 含量は原核生物の生育温度と高い相関を示すことから、「*Haloarcula* 属菌株は高温時には高 GC 含量 (58-59%) の 16S rRNA を含む耐熱性のあるリボソームを、低温時には転写時のエネルギー消費量の少ない低 GC 含量 (56-57%) の 16S rRNA を含むリボソームを機能させる」という仮説を立て、検証した。

はじめに、*Haloarcula* 属 6 菌株を最低生育温度から最高生育温度まで培養し、各温度での 2 種類の 16S rRNA の定量を行った。試料とした *Haloarcula* 属菌株に共通して、最低生育温度 (20°C) では、GC 含量の低い 16S rRNA が GC 含量の高い 16S rRNA の 2 倍量存在した。最高生育温度 (50 ~ 55°C) では、GC 含量の高い 16S rRNA が GC 含量の低い 16S rRNA の 1 ~ 1.8 倍量存在した。次に、*Haloarcula hispanica* を用いて、各 16S rRNA 遺伝子を含むリボソーム RNA オペロンの変異株の作製と培養実験を行った。世代時間に着目すると、25°C では 16S rRNA 遺伝子を 1 コピーのみ有する変異株 (25-28 時間) に比べて野生株 (17 時間) で顕著に短かった。50°C では、GC 含量の高い 16S rRNA 遺伝子を含むリボソーム RNA オペロンのみを有する変異株 (4.2 時間) と野生株 (4.2 時間) の世代時間が等しかった。これらの結果より、低温時の増殖には 2 種類の 16S rRNA が、高温時の増殖には GC 含量の高い 16S rRNA が重要であることが示唆された。*Haloarcula* 属菌株は昼夜で 10°C 以上温度差のある砂漠の塩湖や塩田から単離されている。そのため、2 種類の 16S rRNA 遺伝子を利用することで、*Haloarcula* 属菌株は生息環境の温度変動に適応している可能性がある。

## P-040

## 海洋プラスチックごみに付着していたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)分解細菌の特徴付け

○滝澤 玲香, 鈴木 美和, 橘 熊野, 粕谷 健一

群馬大・院理工

【目的】プラスチック製品は現代の生活に必要な不可欠なものである。一方で、廃棄物の環境汚染が問題となっており、海洋生物に被害をもたらす。これらの問題を解決するために生分解性プラスチックが注目されている。その中でもポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB))は、高い生分解性を有する材料として特に注目されている。今回海洋でのP(3HB)分解機構を理解するために海洋プラスチックごみからP(3HB)分解菌を単離し、特徴付けした。

【方法】海洋環境中から採取したプラスチックごみから、P(3HB)分解菌をクリアゾーン法により単離した。16S rDNA配列解析に基づき進化系統樹を作製し、単離株を同定した。単離株の菌体増殖およびクリアゾーン形成の至適温度、および至適塩濃度を調べた。また、単離株のP(3HB)フィルム分解能力を重量減少法により評価した。また、単離株の生理学的性質および生化学的性質をAPI 20NEおよびAPI ZYMを用いて調べた。

【成績】遺伝学的解析により、単離細菌OKF12株は、*Nocardioides*属細菌と近縁種であることが判明した。P(3HB)を分解する*Nocardioides*属細菌は、初めての報告である。本株を走査型電子顕微鏡で撮影したところ、コリネ型細菌であることが判明した。本株はP(3HB)に加えて、PHBV培地上にクリアゾーンを形成した。本株は50℃以上では成長せず、30℃での菌体増殖およびクリアゾーン形成能が高かった。また、培地組成中のNaCl含有率1%で菌体増殖およびクリアゾーン形成能が最も高かった。しかし、液体培養での各種塩濃度の増殖速度定数は、0%が最も高く、さらに海水の塩濃度である3%でも増殖が確認できた。このことから本株は耐塩性細菌であると推定した。本株はP(3HB)フィルム分解能を有し、その分解速度は0.27 mg/cm<sup>2</sup>/dであった。また、API ZYMを用いた表現型分析により、本株はプロテアーゼ活性を有することがわかった。異なる炭素源を添加して本株を培養し、菌体増殖度と上清活性を測定した結果、P(3HB)およびR3HBでよく増殖した。また、P(3HB)存在下では、LB培地よりも貧栄養なミネラル培地の方が高いP(3HB)分解酵素活性を示した。このことから、P(3HB)分解酵素の発現はLB培地成分により抑制されることが示唆された。

【結論】本株は、海洋におけるプラスチックゴミに付着するP(3HB)分解菌として、実際の海洋中でのP(3HB)分解に重要な役割を果たすと考えられる。



## P-041

# 大腸菌由来アセチル-CoA カルボキシラーゼを用いたマロニル-CoA の増産

○首藤 誉史<sup>1</sup>, 長南 茂<sup>2</sup>

<sup>1</sup>茨城大・院農, <sup>2</sup>茨城大・農

E-mail: 15am207t@vc.ibaraki.ac.jp

【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、パントテン酸から 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) は鍵酵素となっており、*Pseudomonas putida* 由来 CoaA (*PpCoaA*) で *Escherichia coli* の CoA 生合成経路が効率よく強化されることが、当研究室のこれまでの研究から明らかにされている。今回は CoA 生合成経路を強化した *E. coli* の細胞内アセチル-CoA をアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) を用いて脂肪酸合成やポリケチド合成の基質となるマロニル-CoA へ変換することを試みた。

【方法】 *E. coli* からプロモーター領域を含む Acc の 4 つのサブユニット遺伝子 (*accABCD*) を PCR で増幅し、単独あるいは複数組み合わせで pUC118 を用いて Acc の発現プラスミドを構築した。得られた各プラスミドを *PpCoaA* 発現プラスミドと共に *E. coli* DH5  $\alpha$  に形質転換し、5mM パントテン酸および 2% グルコースを含む M9Y 培地で 30℃、24 時間振とう培養した。形質転換体の細胞内アセチル-CoA、マロニル-CoA、および CoA はアシル-CoA サイクリング法で定量した。

【結果および考察】 pUC118 に *accA*、*accBC*、*accABC*、あるいは *accBCD* を持つ形質転換体の生育は Acc 遺伝子を保持しない対照菌とほぼ同じであったが、*accD* の形質転換体では生育が悪く、カルボキシルトランスフェラーゼ サブユニットである *accAD* および全サブユニットである *accABCD* の保持菌にいたっては全く生育しなかった。これらの現象は細胞内の Acc 活性とアセチル-CoA レベルが関係していると考えられた。生育した形質転換体の細胞内 CoA レベルを解析した結果、Acc サブユニットの発現によるアセチル-CoA からマロニル-CoA の変換が観察された。マロニル-CoA/アセチル-CoA を比較すると、対照菌では 0.776 であったのに対し、*accA* では 1.27、*accBC* では 2.16、*accD* で 1.04、*accABC* では 1.29、*accBCD* では 0.873 となった。本研究から、*PpCoaA* によって増大した細胞内アセチル-CoA をマロニル-CoA へ変換するには Acc サブユニットの共発現は有効であることが示された。

## P-042

## クローンライブラリー法による徳島県産阿波番茶茶葉の微生物解析

藤井 美月<sup>1</sup>, 永井 航太<sup>2</sup>, 藤本 大樹<sup>2</sup>, 前川 成美<sup>2</sup>, 秋吉 研二<sup>3</sup>, 井上 翔太<sup>3</sup>, ○佐藤 高則<sup>4</sup><sup>1</sup>徳島大・総科・環境, <sup>2</sup>徳島大・総科・生化, <sup>3</sup>徳島大院・総科・生化, <sup>4</sup>徳島大院・理工・生化

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

過去の研究において我々は、種々の地域で生産される発酵食品中の微生物相について、クローンライブラリー法による検討を行っており、モンゴル国発酵乳中に存在する *Lactobacillus* 属細菌など乳酸菌の系統解析や<sup>(1)</sup>、和歌山県で製造されるなれずし中の微生物相について、*Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属など乳酸菌の系統解析を行った<sup>(2)</sup>。こうした発酵製品中のクローンライブラリー法による微生物に関する知見は、これまで利用が困難であった難培養性微生物の存在を明らかにするとともに、これらを有効利用する上で手掛かりとなる知見を与えることが期待される。

一方四国地方には、碁石茶、黒茶、阿波番茶などの発酵茶が複数存在する。こうした発酵茶を飲む地域は日本でも珍しく、その微生物相や成分に関して注目が集まっている。阿波番茶より単離培養された細菌では *Lactobacillus plantarum* と *Klebsiella pneumoniae* が主要な細菌との報告もあるが<sup>(3)</sup>、その他の微生物相については不明な点も多い。そこで本研究では、徳島県でのみ生産される阿波番茶に着目し、阿波番茶中の微生物相について知見を得るために、クローンライブラリー法による 16S rRNA 遺伝子の解析を行った。

まず、上勝町産および旧相生町産の阿波番茶試料4種の洗浄液より、各々ゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型として *E. coli* 16SrRNA 遺伝子に相同な primer を用いて 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。PCR 産物を pGEM-T ベクターに挿入し、計 70 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、茶葉に付着していたと考えられる *Staphylococcus* 属や *Streptomyces* 属、*Burkholderia* 属細菌など一般細菌が多く検出されたが、発酵性細菌の *Propionibacterium* 属、*Paenibacillus* 属、*Klebsiella* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子と相同なクローンや、さらに *Lactobacillus* 属 (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. vaccinoferus*) および *Leuconostoc mesenteroides* など乳酸菌と相同なクローンも見られた。また、4種の阿波番茶試料ではそれぞれ異なった微生物に相同なクローンが検出されており、阿波番茶でも製品により含有される微生物に相違のあることが示唆された。(1) Satoh, T. et al. ISME15 Abstract book, p.55-56, 2014., (2) 浜地ら, BMB2015 合同大会要旨集, 1P804, 2015, (3) 岡田ら, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 43, 1, p.12 ~ 20, 1996



## P-043

### 超微小バクテリアの純粋培養とそのゲノム解析

○中井 亮佑<sup>1</sup>, 藤澤 貴智<sup>1</sup>, 中村 保一<sup>1</sup>, 西出 浩世<sup>2</sup>, 内山 郁夫<sup>2</sup>, 馬場 知哉<sup>1</sup>, 豊田 敦<sup>1</sup>,  
藤山 秋佐夫<sup>1</sup>, 長沼 毅<sup>3</sup>, 仁木 宏典<sup>1</sup>

<sup>1</sup>遺伝研, <sup>2</sup>基生研, <sup>3</sup>広島大・生物圏

E-mail: rnakai@nig.ac.jp

生物はどこまで小さくなれるのか？微生物（特に細菌）を研究対象とする場合、その最小サイズは本質的な問題といえる。発表者らは、孔径0.2マイクロメートルの除菌フィルターを用いて、野外で採取した試料をろ過し、そのろ液から超微小バクテリアを探索している。その結果として、国内河川水のろ液から終生を極小サイズ（大腸菌の細胞体積の約40分の1）で過ごす新属細菌 *Aurantimicrobium minutum* を単離した。本細菌のゲノムサイズは約1.6 Mbと小さく、近縁グループのそれが3～4 Mbであることから、ゲノム縮小が生じていると思われる。事実、近縁ゲノムでは保存されている幾つかの遺伝子群がそのゲノム中には存在しない。また一方、サハラ砂漠産「砂れき」の懸濁ろ液からは、培養後の細胞サイズが10マイクロメートル以上にまで大きくなる新綱細菌 *Oligoflexus tunisiensis* を純粋分離した。この細菌のゲノムは約7.5 Mbpと比較的大きく、ゲノム中には好気呼吸に関わる複数の末端酸化酵素や異化型硝酸呼吸（脱窒）に関連する酵素をコードする遺伝子が見いだされた。また、RND型異物排出システムをコードする領域なども存在した。以上のように、これまで看過されてきた「ろ液」に存在する極微小生物がさまざまな代謝機能を有する可能性が示された。

## P-044

## セラミックス多孔体への乳酸菌付着性の評価

○田岡 洋介<sup>1</sup>, 境 健太郎<sup>2</sup>, 木之下 広幸<sup>3</sup>, 福山 華子<sup>2</sup>, 小林 太一<sup>2</sup>, 平野 惇<sup>2</sup>, 黒木 教明<sup>4</sup>,  
黒木 美千代<sup>4</sup>, 木村 昭彦<sup>5</sup>

<sup>1</sup>宮崎大・農, <sup>2</sup>宮崎大・地域連携センター, <sup>3</sup>宮崎大・工, <sup>4</sup>黒木建設(株), <sup>5</sup>キムラ漬物宮崎工業(株)

E-mail: yousuketao@cc.miyazaki-u.ac.jp

宮崎県は平成25年度にフードビジネス振興構想を打ち出し、県内の豊富な素材の多様な加工・製造による付加価値の向上」を掲げている。本研究は、宮崎で生産の盛んな大根の糠漬けなどの漬物製品の高付加価値化を図るために、乳酸菌リッチな漬物容器の開発を目的とした。糠床より単一の炭素源を含んだ種々の寒天培地を用いて乳酸菌を分離した。分離株の16S rRNA遺伝子配列(500-600bp)を基にBlast検索を行ったところ、分離株はいずれも*Lactobacillus*属と判明した。乳酸菌の付着に最適な陶器製の漬物容器を作成するため、POM樹脂の粘土への混合率を0-30%とし、異なる温度(1000℃、1100℃)で焼成させた陶器片を作成した。これらの陶器片を用いて、糠床由来の*Lactobacillus* sp. GYP-74株の付着試験を行った。1/100 MRS培地に陶器片を浸漬させ、GYP-74株を同培地に添加した。27℃、45時間静置したのち、陶器片を細かく破碎、生理食塩水を用いて段階希釈列を作成し、MRS寒天培地上での生菌数を算出した。その結果、焼成温度1000℃と比較して、1100℃で作成した陶器片においてGYP-74株の付着率が高まることが分かった。作成した陶器片の細孔分布をポロシメーターにより測定したところ、粘度のみの陶器片では数 $\mu$ m以下の気孔が主として分布しており、POM樹脂を混合した陶器片では数 $\mu$ m～数百 $\mu$ m気孔が数多く分布していた。陶器片の結晶構造を解析するため、X線回析測定を行った。得られたX線回析パターンに対してICDDデータベース検索を行い、鉱物同定を行ったところ、1000℃と1100℃で焼成させた両セラミックにはQuartz及びHematiteを含有することが分かった。一方、1000℃ではMicroclineを、1100℃ではMulliteを特徴的に含有することが分かった。本研究により、乳酸菌を数多く付着させるための陶器片の作成、またその条件に関する基礎的知見を得ることができた。今後は、本技術を用いて実際に漬物容器を開発し、漬物発酵過程の微生物の動態並びに漬物成分の変動を調査することで、乳酸菌強化漬物容器の実用化を目指す。

## P-045

**Complete genome analysis of a nonylphenol-degrading bacterium *Sphingobium cloacae* JCM10874<sup>T</sup>**

○Mina Ootsuka<sup>1</sup>, Yoko Yoshioka-Ikunaga<sup>1</sup>, Tomoyasu Nishizawa<sup>2</sup>, Morifumi Hasegawa<sup>2</sup>, Yasurou Kurusu<sup>2</sup>, Hiroyuki Ohta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology,

<sup>2</sup>Ibaraki University College of Agriculture

E-mail: s159293t@st.go.tuat.ac.jp

Alkylphenols such as nonylphenol (NP) and octylphenol (OP) are known to be endocrine disrupting agents and found as degradation products of industrial detergents, NP- and OP-polyethoxylates, in the natural environment. In an early work by Fuji *et al.*, a bacterium (JCM10874<sup>T</sup>) able to degrade NP was isolated from wastewater of a sewage treatment plant in Tokyo and identified as a novel species, *Sphingomonas cloacae*, later reclassified as *Sphingobium cloacae*, in the class *Alphaproteobacteria*. In this study, we analyzed the complete genome sequence of strain JCM10874<sup>T</sup> to characterize the NP degradation genes. Genomic DNA of the strain JCM10874<sup>T</sup> was sequenced by the PacBio RS II system and annotated using the MiGap, RAST and BLASTP programs. Strain JCM10874<sup>T</sup> consists of 3,767,292-bp one circular chromosome, SCLO1 (coverage of 322-folds) with 64.6% G+C content and contains 3,302 coding sequences (CDSs), 6 rRNA operons and 50 tRNA genes, and five circular plasmids, pSCLO2 (375,493bp, 64.9% G+C, 334 CDSs, coverage of 301-folds), pSCLO3 (151,712bp, 62.8% G+C, 137 CDSs, coverage of 340-folds), pSCLO4 (108,910bp, 63.7% G+C, 92 CDSs, coverage of 225-folds), pSCLO5 (57,701bp, 63.5% G+C, 53 CDSs, coverage of 85-folds), pSCLO7 (33,768bp, 62.9% G+C, 33 CDSs, coverage of 32-folds), and a linear plasmid, pSCLO6 (52,690bp, 62.4% G+C, 51 CDSs, coverage of 99-folds). From the genomic analysis, the strain was found to possess the genes encoding octylphenol 4-monooxygenase (*opdA*), nonylphenol monooxygenase (*nmoA*) and hydroquinone degradation gene cluster. From these genetic analyses, it can be concluded that both OP and NP are transformed to hydroquinone (HQ) and 1,2,4-benzenetriol by *opdA* and *nmoA*, thereafter HQ and 1,2,4-benzenetriol are degraded by hydroquinone degradation enzymes. Further analyses are now in progress to compare the degradation genes of another related OP- and NP-degrading bacterium *Sphingobium amiense* strain YT<sup>T</sup>.

P-046

海洋性 *Pseudomonas* sp. の産生するセルラーゼの性状

○田中 大貴<sup>1</sup>, 渡邊 誠也<sup>1,2</sup>, 松原 孝博<sup>3</sup>, 鈴木 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>愛媛大 CMES, <sup>2</sup>愛媛大農, <sup>3</sup>愛媛大南水研セ

E-mail: c641018c@mails.cc.ehime-u.ac.jp

【目的】 養殖用配合飼料の主原料は輸入に依存している。今後持続可能な養殖のためには豊富にある国内の植物素材の活用が有望である。しかし、海産養殖魚はセルロースを直接分解できないため、植物セルロースをセロオリゴ糖として与える必要がある。本研究では、海産草食魚を宿主とするセルラーゼ産生菌が有望なセルラーゼ起源と考えた。現在まで、海産草食性魚腸内のセルラーゼ産生菌を単離した報告は 1 例のみであり、その酵素の性状についての報告はない。今回は海産魚腸内からセルラーゼ産生菌を単離し、菌の生育条件およびセルラーゼの性状解明を行った。【方法】 クロメジナ (*Girella leonina*) 消化管内から 1/10 Marine Agar にセルラーゼ基質 Azurine-Crosslinked Hydroxyethyl Cellulose(AZCL) を添加した培地を用いてセルラーゼ産生菌を単離した。単離株は 16S rRNA 遺伝子による系統解析を行い、生育の温度・塩分・pH 依存性を調べた。セルラーゼは培養上清から硫酸沈殿で濃縮し、活性検定は Carboxymethyl cellulose(CMC) を基質とし、生成する還元糖を 2-Cyanoacetamide 法で定量した。【結果】 3 株のセルラーゼ産生菌が単離され、いずれの株も *Pseudomonas* sp. であった。3 株は 30℃、人工海水、pH 7-8 が至適発育条件であったことから、海洋環境での生育に適した種であると考えられた。セルラーゼ活性のもっとも高い GL-2 株のセルラーゼは、活性至適を 60℃、pH6-8 で示した。20℃での残存活性は 32.8% であった。市販セルラーゼ(エンチロン)では 20℃の残存活性は 17.1% であったので、GL-2 株の酵素は、高温至適ではあるが、低温でも活性を保つことが分かった。本株の養殖魚腸内でのプロバイオティクス、あるいは酵素の工業的利用などが今後の課題である。

## P-047

### 海洋中の 1,4-ジオキサン分解細菌の解析

○安部 智子<sup>1</sup>, 本田 力<sup>1</sup>, 鎌田 泰彰<sup>2</sup>, 椎葉 究<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京電機大・理工, <sup>2</sup>東京電機大・院理工

E-mail: t\_abe@mail.dendai.ac.jp

1,4-ジオキサンは水や他溶媒に対する親和性が高く、優れた溶媒として従来から様々な用途で使用されてきた。主な用途としては、有機塩素系化合物の安定剤として利用されているほか、ワックスや化粧品、農薬、ゴム、プラスチック、医薬品の溶媒等、幅広い分野で用いられてきた。しかしながら、本化合物の発がん性が示唆され、国内では、H21年11月に「健康保護に係る水質環境基準項目」及び「地下水環境基準項目」に追加され、基準値は、共に 0.05 mg/L 以下と定められた。国内の超過基準の報告例としては、廃棄物処理場の近くにおいて数件確認されているほか、河川等でも報告例がある。この1,4-ジオキサンの浄化法として我々は、時間を要するものの低コストであり二次環境汚染のリスクが低く複雑な管理を必要としない微生物によるバイオレメディエーション法を検討している。

近年、1,4-ジオキサン分解能を持つ微生物が僅かではあるが陸圏で発見されている。本研究では、陸圏よりも貧栄養状態かつ厳しい環境条件である海洋に生息する微生物群から1,4-ジオキサン分解菌の探索を行った。海水からの1,4-ジオキサン分解菌の集積には、土壌から迅速・簡便に難分解性有機汚染物質を集積・単離できる土壌・木炭還流法<sup>1)</sup>を応用した。また、還流液中の1,4-ジオキサン濃度は、我々が開発した高速液体クロマトグラフィーによる測定法<sup>2)</sup>を用いて継時的に測定した。その結果、1,4-ジオキサン分解能を持つ可能性のある細菌がいくつか単離された。単離されたこれらの細菌について、16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統解析を行うとともに、1,4-ジオキサン分解に関わる遺伝子の探索を行い、海洋中に存在する1,4-ジオキサン分解菌について解析した。

1) Takagi, K. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4452-4458 (2009)

2) Matsui, R. *et al. Biodegradation.* 27, 155-163 (2016)



## P-048

## 白神山地からの酵母分離株と清酒醸造酵母との性状比較

○森山 裕理子<sup>1</sup>, 青山 嘉宏<sup>2</sup>, 横山 心結<sup>2</sup>, 殿内 暁夫<sup>1</sup><sup>1</sup>弘前大・院農, <sup>2</sup>弘前大・農

【目的】我々は世界自然遺産・白神山地における酵母の生息環境・分布・系統的特徴に関して研究を進め、これまでに白神山地特有の酵母系統が生息すること、酵母はミズナラのリターと強く関連することを明らかにしてきた（2015年度微生物生態学会）。今回は、白神由来の酵母株の実用可能性を検討する過程で清酒酵母株との間で興味深い生理的な差異を見出したので報告する。【方法】白神山地を中心に採取したリター・樹皮などから集積培養により *S. cerevisiae* の分離を試みた。分子系統解析は4つのSNP領域 (*DSN1/NUP116/IntAY/IntFR*) を用いて行った。分離株の数株を用いて合成培地 (YPD培地/最小培地) や麴汁培地 (Brix 11%) などの液体培地で培養し、清酒醸造株 (協会901号他) との比較を行った。低pHでの生育比較には乳酸でpH 2.5-5.0に調整した培地を用いた。また、清酒醪中での生育を比較するために、小規模の清酒醸造試験 (小仕込み) を行った。【結果・考察】914の試料から80株の *S. cerevisiae* (以下白神酵母) を分離した (2016年8月9日現在)。分離に成功した試料の多くはミズナラ (分離株の32.9%) およびブナ (同じく26.3%) のリターであった。4つのSNP領域による系統解析により、白神酵母は一部を除いてワイン酵母・清酒酵母・他の野生株とは異なる複数のクラスターを形成した。清酒の小仕込みにおいて清酒酵母醪のアルコール度数は19%であるのに対し、白神酵母醪は15%であり、白神酵母は醪中での発酵能力が著しく劣っていた。pH4.0以上の麴汁培地では白神酵母と清酒酵母の間に顕著な生育差は認められなかったが、pH 3.5以下では白神酵母の生育速度が清酒酵母に対して著しく低下した。一方、pH 3.5以下のYPD培地では清酒酵母の生育速度が白神酵母に比較して低下した。これらのことから、低pHの麴汁培地中に白神酵母の生育抑制因子や清酒酵母の生育促進因子の存在が推測された。白神酵母の低pHの麴汁培地での生育抑制は低pH麴汁培地 (pH2.7) で継代培養することにより改善され、株によっては清酒酵母よりも良好な生育を示した。現在、低pH麴汁培地での白神酵母の生育抑制や継代培養による生育改善の原因を探るために、培地成分の分析・遺伝子の発現解析・代謝物解析を計画している。



## P-049

**Bradyrhizobium sp. RD5-C2 においてクロロフェノキシ酢酸類の分解を担う遺伝子の同定**

○田中 翔, 林 昌平, 巢山 弘介, 井藤 和人

島根大・院生資

E-mail: a169804@matsu.shimane-u.ac.jp

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は除草剤として、4-クロロフェノキシ酢酸 (4-CPAA) は植物成長調整剤として知られている人工化合物である。現在までにこれらの人工化合物を分解する多様な細菌が単離・同定されている。*Bradyrhizobium* sp. RD5-C2は、クロロフェノキシ酢酸類が散布されたことのない島根大学の土壌から単離されたにも関わらず、この化合物を分解することができる。また、ゲノム解析によって、RD5-C2におけるクロロフェノキシ酢酸類の分解を担う候補遺伝子として、*cad1* cluster (*cad1RABKC*)、*cad2* cluster (*cad2RABCK*)、*tfdA*  $\alpha$  をもつことが明らかになった。そこで、本研究ではクロロフェノキシ酢酸類の分解酵素をコードする *cad1A*、*cad2A*、*tfdA*  $\alpha$  を欠損させた RD5-C2 の遺伝子欠損株のクロロフェノキシ酢酸類の分解能を調査することで、RD5-C2 においてどの遺伝子がどの程度の割合でクロロフェノキシ酢酸類の分解を担うのかを明らかにする。*cad1A* 欠損株の 2,4-D 分解能は野生株のそれと比べて著しく低下した。*cad2A* 欠損株と *tfdA*  $\alpha$  欠損株は野生株と同様に 2,4-D を分解した。*cad2A* 欠損株と野生株の 2,4-D 分解能には差が見られなかったが、*cad1Acad2A* 欠損株の分解能は *cad1A* 欠損株のそれと比べて低下した。*cad1Acad2A* 欠損株は 2,4-D を全く分解しなかった。これらの結果から、RD5-C2 において、*cad1* cluster と *cad2* cluster が 2,4-D を分解しており、主に *cad1* cluster がその分解を担っていることが示唆された。*cad1A* 欠損株の 4-CPAA 分解能は野生株と比べて低下したが、2,4-D の場合ほど顕著ではなかった。*cad2A* 欠損株と *tfdA*  $\alpha$  欠損株は野生株と同様に 4-CPAA を分解した。*cad2A* 欠損株と野生株の 4-CPAA 分解能には差が見られなかったが、*cad1Acad2A* 欠損株の 4-CPAA 分解能は *cad1A* 欠損株のそれと比べて低下した。しかし、*cad1Acad2A* 欠損株の 4-CPAA 分解能は残っていた。また、*cad1Acad2A* 欠損株と *cad1Acad2AtfdA*  $\alpha$  欠損株の 4-CPAA 分解能には差が見られなかった。これらの結果から、RD5-C2 において、*cad1* cluster と *cad2* cluster および、*tfdA*  $\alpha$  以外の未知の遺伝子が 4-CPAA を分解しており、*cad1* cluster が *cad2* cluster より優位にその分解を担っていることが示唆された。

## P-050

# 白神山地土壌から分離した好酸性新規放線菌の系統分類学的研究

○殿内 暁夫, 松尾 平三

弘前大・院農

E-mail: symbio@hirosaki-u.ac.jp

1993年にユネスコの世界自然遺産として登録された白神山地はブナ原生林が広範に分布することで知られている。白神山地土壌にはAcidobacteria門細菌を始めとして未分離の細菌が豊富に生息することが我々のこれまでの研究でわかっている。今回は白神山地土壌から分離した好酸性の新規放線菌株について報告する。2013年6月14日に青森県西目屋村の弘前大学附属白神自然観察園にて採取した土壌から貧栄養のPPM培地(pH4.5)用いて希釈平板法により細菌株の分離を行った。得られた細菌株の中から新規性の高い放線菌株SK-25を選択し、新規分類群として記載するために、生理学的・生化学的・形態学的・系統学的解析を行った。SK-25株は白色不透明、円形、全縁で粘性のないコロニーを形成した。コロニーからの気菌糸の形成は確認されなかった。細胞は約1.0 μmの菌糸状で、菌糸から分岐した短枝の先端に孢子(1.0-2.0 μmの卵形)を形成した。グラム染色は陽性、カタラーゼ・オキシダーゼ活性は共に陽性、硝酸還元能は陰性であった。グルコース・セロビオース・デンプン・キシランなど、単糖から多糖までの幅広い糖質を増殖基質として利用した。生育可能なpH範囲は3.0~5.5(至適4.0)と好酸的であり、SK-25株は白神山地土壌の低いpH(4.1~4.9)に適応していることが考えられた。16S rRNA遺伝子配列に基づく分子系統解析により、SK-25株の最近縁種はThermomonosporaceae科のActinoallomurus coprocola(配列相同性93.0%)であるが、NJ/ML系統樹上ではActinoallomurus属で形成されるクラスタとは独立していることが示された。Actinoallomurusに所属する種は、気菌糸を形成し、生育pH条件として弱酸性を好むなど、SK-25株とは異なる特徴をもつ分類群である。以上の結果に基づきSK-25株を新規分類群として記載する予定である。

## P-051

### 白神山地土壌から分離した放線菌に関する研究

○ツアンバ オユンゲレル, 松尾 平三, 殿内 暁夫

弘前大・院農

【目的】白神山地の土壌から分離した *Actinobacteria* 門の *Actinospicaceae* 科に所属する新規放線菌株 P311-7 を新規分類群として記載するために、生理学的・生化学的・系統学的・分子系統学的な特徴解析を行ったので報告する。【方法】P311-7 は 2014 年 05 月 21 日に採取した弘前大学附属白神自然観察園の土壌から、低栄養の土壌抽出液 PPM 培地を用いた希釈平板培養法により分離した。本菌株の生理学的・生化学的・形態学的・分子系統学的な特徴は、ISP2 培地および炭素源として 0.3% グルコースを含む Yeast Nitrogen Base (YNB) 培地を基本培地として用いて解析した。分子系統解析は 16S rRNA 遺伝子配列を用いて行った。【結果】P311-7 株は細胞が糸状形態を示すグラム陽性細菌で、*Actinospica acidiphila* と 94.8%, *Actinospica robiniae* と 94.4% の 16 S rRNA 遺伝子配列相同性を示し、*Actinobacteria* 門の *Actinospicaceae* 科に所属することが示された。P311-7 株の生育 pH 範囲は pH 3.5-6.0 (至適 5.0-5.5), 生育温度範囲は 15°C -40°C (至適 30°C) で、NaCl 範囲は 0%-1.5% の生理学的特徴が確認された。カタラーゼとオキシダーゼ活性は陽性であった。P311-7 株の主要呼吸鎖キノンは MK-9(H<sub>6</sub>) と MK-9(H<sub>8</sub>) であった。ペプチドグリカンのジアミノピメリン酸は meso-A<sub>2</sub>pm で近縁種である *A. acidiphila* と *A. robiniae* の meso-3OH とは異なっていた。主要な細胞脂肪酸は i-C<sub>16:0</sub>、ai-C<sub>15:0</sub> および C<sub>16:0</sub> であった。GC 含量は 70.9 mol% であった。以上の結果に基づき、P311-7 は属レベルで新規な *Actinospicaceae* 科細菌種であると判断し、新属・新種として記載報告する予定である。

## P-052

# 白神山地土壌から分離した新規*Acidobacteria*門細菌に関する研究

○工藤 千沙希, 松尾 平三, 殿内 暁夫

弘前大・院農

【背景・目的】 *Acidobacteria*門細菌は土壌、鉱山廃液など様々な環境に普遍的に生息する極めて多様性の高い細菌グループで、白神山地土壌においても*Acidobacteria*門細菌が優占している。しかし、*Acidobacteria*門細菌は分離例が少なく生態や機能などは不明なことが多い。我々は白神山地土壌から新規性の高い複数株の*Acidobacteria*門細菌の取得に成功しており、そのうち*Acidobacteriaceae*科に所属するSK-11株について系統分類学的研究を行ったので報告する。

【方法】 分離源とした土壌の採取場所は弘前大学白神自然環境研究所附属白神自然観察園の尾根部で、地表面から約10 cmの深さの土壌（A層）を採取・処理した。土壌懸濁液を段階希釈し、同所の土壌の抽出液で調製した貧栄養培地（1/2GNS培地）により平板培養することで細菌分離株を得た。分離株のうちSK-11と命名した株をYNB液体培地または1/2GNS培地を用いて培養し諸解析を行った。分子系統解析は、16S rRNA 遺伝子配列に基づいて行った。

【結果・考察】 SK-11株は*Acidobacteria*門subdivision1の*Acidobacteriaceae*科に所属する*Acidicapsa ligni*と*Acidicapsa borealis*とそれぞれ96.6%および96.5%の16S rRNA 相同性を示し、NL/ML系統樹でも両種と同一のクラスターを形成した。SK-11株と*A. ligni*および*A. borealis*との比較試験の結果、SK-11株は両種と比較して生育pH範囲が狭く、低濃度のNaClに感受性を示し、キシラン利用性が良好であるが、メレジトースやリボースを利用できないなどの生理・生化学的な差異が確認された。SK-11株の生育pH範囲はpH 4.0-5.5（至適pH 5.0）であり、分離源である白神自然観察園土壌のpH範囲（pH 4.1-4.9）と生理的に適応していることが示された。植物由来の糖質であるキシロース、セロビオース、マンノース、キシランの利用性が良好であることから、土壌中においてこれらの物質代謝に関与していることが考えられた。本研究の結果に基づき、SK-11株を*Acidicapsa*属の新種"*Acidicapsa shirakamiensis* sp.nov."と命名し提案する予定である。



## P-053

### 山形県飛鳥沿岸海水および海藻に生息する放線菌の探索

○堀 翔太<sup>1</sup>, 羽田 来留美<sup>2</sup>, 入江 佳奈<sup>2</sup>, 服部 聡<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>山形大院・農, <sup>2</sup>山形大・農

【目的】 海水には多種多様な微生物が生息していることが知られている。同様に、海藻にもその細胞内外に微生物が生息しており、海藻 - 微生物間で共生関係を形成しているものも存在していることが報告されている。しかし、海水および海藻に生息する微生物の中でも、有用細菌として知られる放線菌に関する知見は多いとはいえない。そこで本研究では、山形県飛鳥沿岸海域の海水および海藻に生息する放線菌を対象として純粋分離を試みるとともに、その多様性を明らかにすることを目的とした。

【方法】 海水およびモズクなど数種類の海藻を採取し、これらを試料とした。海藻は海水に由来する微生物の混入を防ぐため、滅菌した人工海水で洗浄したのち、DNA抽出と培養に供試した。海藻からDNAを抽出する際は、無菌環境下で液体窒素を用いて破碎したものをを用いた。また、海水は無菌的に減圧ろ過・濃縮したものをDNA抽出と培養に供試した。それぞれのDNAを鋳型として、放線菌 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いたクローニングにより塩基配列約 640 bp を決定し、相同性解析を行った。また、海藻および海水試料それぞれを段階希釈したものを放線菌選択的平板培地に植菌し、分離株の取得を行った。

【結果および考察】 採取した海藻のうち、モズクに生息する微生物から放線菌の菌叢解析を試みたが、これらに近縁なクローンは見出されなかった。そのため、モズクに生息する放線菌は極めて少ないか、生息していない可能性が考えられた。現在、他の海藻種の解析を行うとともに、それらから得られた分離株の解析を行っているところである。一方、海水中の放線菌を対象として菌叢解析を行った結果、放線菌門の *Acidimicrobiia* 綱および *Actinobacteria* 綱のそれぞれに属す多様なクローンが検出された。これらのことから、海水中には多種多様な放線菌が生息していることが示唆された。実際に、海水試料から培養により様々な放線菌分離株を取得することができた。これらの分離株の中には新規の放線菌も含まれていたことから、海水は未知の放線菌を取得する上で有力な分離源であることが考えられた。

## P-054

## 汽水湖から単離された新奇極小細菌の新種・新属提案に向けた解析

○前島 由明<sup>1</sup>, 久志本 晃弥<sup>2</sup>, 村口 雄亮<sup>2</sup>, 佐藤 安里紗<sup>1</sup>, 飯野 隆夫<sup>3</sup>, 大熊 盛也<sup>3</sup>, 金原 和秀<sup>2</sup>, 新谷 政己<sup>2</sup>

<sup>1</sup>静大・工, <sup>2</sup>静大院・総合科技, <sup>3</sup>理研・BRC-JCM

【背景と目的】静岡県浜松市にある佐鳴湖は、化学的酸素要求量（COD）の高い汽水湖として知られており、特殊な微生物生態系が存在することが示唆されてきた。我々は湖水の成分分析のために、孔径0.22  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで湖水をろ過したところ、ろ液にフィルターを通過可能な微生物が存在した。そこで、これらの微生物の単離を試みたところ、フィルター通過可能な極小細菌として145株を単離することに成功した。得られた菌株の16S rRNA 遺伝子配列を解読し、相同性検索を行った結果、5株（Ys株, RF111005株, M8-2株, M15株, M34株）については新規性の高い細菌であることが示唆された。そこで、我々はこの5株について、系統分類学的に同定して帰属を明らかにすることを目的とした。【方法】上記5株に対して形態学的性状、生理・生化学性状、化学分類性状、分子系統学的位置の4つの観点から以下実験・解析を行い、特徴付けを行った。まずグラム染色、2%リントングステン酸によるnegative染色法を用いて透過型電子顕微鏡で観察し、形態学的性状を調べた。温度、pHに対する生育の可否、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性の評価を行うことで生理・生化学性状を調べた。化学分類性状については、キノンタイプと菌体内脂肪酸組成を、それぞれHPLCとMIDIシステムにて解析を行った。また、近隣結合法を用いて、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹を作成し、分離株の分子系統学的な解析を行った。【結果と考察】5株はいずれもグラム陰性の好気性桿菌であった。また、5株の至適生育温度は30°C（Ys, RF111005, M15, M34株）もしくは35°C（M8-2株）、Ys株を除く4株の至適生育pHは7.0（RF111005株）、7.5（M8-2, M15, M34株）であった。主要なキノンは、RF111005株を除く4株について、MK-6（M34株）またはMK-7（Ys, M8-2, M15株）であった。主要な脂肪酸はiso-C<sub>15:0</sub>（Ys, RF111005, M8-2, M15株）またはiso-C<sub>15:1</sub>G（M34株）であったことから、各近縁種と同様であることが明らかとなった。また、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統分類学的解析から、4株はBacteroidetes門のCytophagales目もしくはFlavobacteriales目に分類され、近縁種との相同性は92~94%であった。Deltaproteobacteria綱に分類されたRF111005株は、最も近縁な培養株（*Geobacter grbiciae* TACP-2<sup>T</sup>株）との相同性が82%と非常に低かった。



## P-055

# Redox 環境の変化に適応できる津波堆積物由来の新規硫黄酸化細菌の特徴

○猪原 英之<sup>1</sup>, 堀 知行<sup>2</sup>, 高崎 みつる<sup>3</sup>, 片山 葉子<sup>4</sup>

<sup>1</sup>農工大・連合農, <sup>2</sup>産総研・環境管理, <sup>3</sup>石巻専修大・理工, <sup>4</sup>農工大・院農

E-mail: ihara.fuji@gmail.com

<背景> 海洋堆積物は有機物の貯蔵庫として物質循環に重要な役割を担う。有機物に富んだ海洋堆積物では嫌気環境が形成され、周辺の生態系に悪影響を与える。海洋堆積物の Redox 環境は潮流や生物活動によって変化し、例えば酸化環境の形成は有機物の好気的な分解を促進する一方で、堆積物が保持する重金属などの有害物質の挙動にも影響する。微生物は堆積物内の物質の変換に強く関与するが、Redox 環境の変化に対する微生物群集の応答は不明確である。発表者らは津波で打ち上げられた堆積物を用いて、微生物群集の酸化環境下での変遷初期に硫黄酸化細菌が劇的に増加することを示した。さらに、優占した硫黄酸化細菌の分離に取り組み、堆積物内で優占した OTU と高い相同性を持つ 4 つの純粋菌株 (TSL1, TSL2, TSL3, TSL6) の分離に成功した。今回の報告では分離菌株の生理学的特徴を調べ、既知の硫黄酸化細菌の特徴と比較して堆積物内で優占できた要因を探る。<方法> 宮城県東松島市の水田地帯に打ち上げられた津波堆積物を、大気環境下に置くことで硫黄酸化細菌を集積し、その後チオ硫酸ナトリウムや単体硫黄をエネルギー源とした無機塩培地を用いた限界希釈法により硫黄酸化細菌を分離した。生育可能 pH、酸素要求性などの生理学的特徴を調べ、既知の近縁種との特徴と比較した。<結果と考察> TSL1, TSL6 株は Epsilonproteobacteria 網の *Sulfurovum aggregans* が近縁であったが、16S rRNA 遺伝子の相同値はそれぞれ 97, および 96% と低く、新たな細菌種である可能性が示された。一方、TSL2, TSL3 株は Gammaproteobacteria 網の *Thiomicrospira crunogena* にほぼ 100% の相同値を示した。従来報告されている Epsilonproteobacteria 網の硫黄酸化細菌はいずれの種においても大気レベルの酸素濃度では生育が抑制されるのに対し、TSL1, 及び TSL6 株は大気レベルの酸素濃度で良好に生育できるという新規の特徴を示した。このような酸化環境に対する高い適応性が津波堆積物で分離菌株が優占した要因であり、これらの硫黄酸化細菌が酸化環境に変化した際の堆積物内の物質循環を強く左右する可能性が示された。

## P-056

### *ldhA*の確率的な発現による persister 形成と制御

○山本 尚輝<sup>1</sup>, 一色 理乃<sup>1</sup>, 河合 祐人<sup>1</sup>, 田中 大器<sup>2</sup>, 関口 哲志<sup>2</sup>, 松本 慎也<sup>3</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早大院・先進理工・生医, <sup>2</sup>早大・ナノ・ライフ創新研究機構, <sup>3</sup>名大・医

近年、同一遺伝子を持つクローナルな細菌集団にも表現型に不均一性があることが明らかになってきた。persister は表現型の変異によって出現し、細菌集団中でほとんど増殖を行わず、増殖を標的とした抗生物質の影響から逃れて生き残ることができる。

当研究室ではこれまでに独自に開発した非分裂細菌を検出する大腸菌の persister マーカー株によって persister を分取し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、乳酸発酵遺伝子である *ldhA* が persister 形成に重要な関係性を持つことが示唆された。そこで、本研究では *ldhA* による persister 形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

persister は表現型の変異によって出現するために、集団レベルで persister を解析することは困難である。そこで、生細菌内で *ldhA* の発現を可視化し、その発現量をシングルセルレベルで検出した。*ldhA* の発現を可視化するために、*ldhA* のプロモーター配列の下流に蛍光タンパク質である Venus を持つプラスミドを作製し、大腸菌へ導入した。本株をマイクロ流体デバイス中で培養することで 1 細胞レベルのタイムラプス観察を行った。本研究で用いたマイクロ流体デバイスには高さ 1  $\mu$  m の狭い流路が存在し、細菌を遊走させることなく長時間観察することが可能である。タイムラプス観察の結果、*ldhA* の発現は確率的で、一部の細菌が一時的に強く発現することが明らかとなった。さらに、*ldhA* の発現が見られた細菌は増殖抑制及び抗生物質に対する抵抗性を示したことから、大腸菌は *ldhA* の発現によって persister を形成することが示唆された。

次に、*ldhA* を標的とすることで persister の制御を試みた。persister は実際の環境中ではバイオフィームなどの様々なストレス環境下で存在していることから、本研究ではその代表的なストレス環境として、貧栄養環境、酸性環境、嫌気環境下で培養した。各環境下で大腸菌の *ldhA* ノックダウン株を CRISPRi によって作製し、抗生物質投与後の生存率を調べた結果、嫌気環境のみで persister が有意に減少した。以上の結果から、*ldhA* が嫌気環境において persister 制御の標的となり得ることが示唆された。

## P-057

# 微細気泡エアレーションが大腸菌のせん毛運動を抑制する

○山梨 由布<sup>1</sup>, 山下 美雪<sup>1</sup>, 石間 経章<sup>2</sup>, 川島 久宜<sup>2</sup>, 林 史夫<sup>3</sup>, 伊藤 司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>群馬大学大学院 理工学府 環境創生, <sup>2</sup>群馬大学大学院 理工学府 知能機械創製,

<sup>3</sup>群馬大学 研究・産学連携推進機構 機器分析センター

細菌のせん毛は界面への付着およびバイオフィーム形成のために重要な組織であり、せん毛運動を制御することは細菌の存在状態を制御することにつながる。我々は大腸菌を微細気泡のエアレーションに曝すことにより、せん毛の形成および運動が抑制されることを明らかにしたので報告する。

微細気泡の発生には本研究室で開発した超小型の微細気泡発生装置 MiBos を用いた。気泡径は約 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  である。粗大気泡の発生（通常エアレーション）には一般的な水槽用散気管を用いた（気泡径 数 mm 以上）。これらを用いて M9 培地（10 倍希釈）に空気を送気して大腸菌 K12 を培養し、網羅的遺伝子発現解析、せん毛の電子顕微鏡観察等を行った。また、微細気泡エアレーションに曝された大腸菌と通常エアレーションに曝された大腸菌をそれぞれチューブに通水し、チューブ内のバイオフィーム形成量を比較した。

網羅的遺伝子発現解析の結果から、微細気泡エアレーションでは通常エアレーションよりもせん毛運動に関連する遺伝子群の発現が抑制されていることが示された。そこで透過型電子顕微鏡で形態観察したところ、通常エアレーションに曝された大腸菌細胞にはせん毛がたくさん見られたが、微細気泡エアレーションではせん毛が多い細胞は見つからず表現型としてもせん毛形成が抑制されていることが確認された。また、微細気泡エアレーションに曝された大腸菌のバイオフィーム形成量は通常エアレーションの半分程度であったことから、微細気泡エアレーションはせん毛運動を抑制する効果が高かったと考えられた。

超小型微細気泡発生装置 MiBos を用いた微細気泡エアレーションは、遺伝子操作によらずせん毛運動の効果を評価でき、また、薬剤等を用いずにせん毛運動を抑制できる有用な方法であるといえる。

## P-058

## 大腸菌の persister 形成を誘導する多様な経路

○河合 祐人<sup>1</sup>, 一色 理乃<sup>1</sup>, 山本 尚輝<sup>1</sup>, 松本 慎也<sup>1</sup>, 奥田 修二郎<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早大・先進理工・生命医科, <sup>2</sup>新潟大院・医歯・バイオインフォマティクス

E-mail: y-kawai0220@asagi.waseda.jp

【目的】1つの細菌から増殖したクローン集団は全て同じ性質を持つとされており、集団中の各個体間の差は平均化されている。しかし近年の1細胞レベルの観察技術の発展により、遺伝子的にクローンな集団であっても、多様な表現型を持つことが分かってきた。特に persister と呼ばれる表現型は細菌の重要な生存戦略となっている。persister とは自ら増殖を抑制している状態の細菌であり、細胞増殖を標的としている抗生物質に高い抵抗性を示す。persister は集団中にごく一部しか存在しないが、致死的な環境の変化に対しても全滅を防ぐ役割を持っている。しかし集団中の一部でのみ persister が生まれる分子機構はいまだ明らかとなっていない。【方法】 persister 形成に関わる分子機構を明らかにするため、persister を選択的に分取する手法を開発した。細胞分裂時にのみ重合することが知られる FtsZ をターゲットとして、その両端に CFP および YFP の蛍光タンパクを融合した。融合タンパク質 YFP-FtsZ-CFP は通常時には CFP 蛍光を発するが、分裂している細菌では YFP-FtsZ-CFP が近接することで蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を起こし、YFP 蛍光を発する。この FRET 蛍光の有無を基にセルソーターを用いて分裂細菌と非分裂細菌を分取し、トランスクリプトーム解析によって非分裂状態で特異的に発現している遺伝子を網羅的に解析した。また、網羅解析によって明らかとなった遺伝子が persister 形成に関与していることを過剰発現および CRISPRi を用いたノックダウンにより確認した。【結果・考察】 persister では嫌気代謝の遺伝子が高発現していることが示唆された。そこで候補遺伝子の過剰発現株を構築して抗生物質から生き残る割合を評価した。その結果乳酸発酵遺伝子である *ldhA* の過剰発現によって persister は 100-1000 倍増加した。しかしノックダウン株では培養条件によっては persister の減少が見られなかった。そのため persister が減少しなかった環境では、*ldhA* 以外の経路を介して persister 形成が起こっていると考えられる。そこで培養環境を変化させ、それぞれの環境から persister を分取し、RNA-sequencing を行った。現在トランスクリプトームを解析中である。



## P-059

# Sphingobium barthaii KK22 による多環芳香族炭化水素 (PAH) 生分解の化学的および遺伝的解析

○前田 亜鈴悠<sup>1,2</sup>, 西 真郎<sup>2</sup>, 秦田 勇二<sup>3</sup>, 大田 ゆかり<sup>2</sup>, 國廣 真里枝<sup>4</sup>, カナリー ロバート<sup>1</sup>

<sup>1</sup>横浜市・院理, <sup>2</sup>JAMSTEC, <sup>3</sup>埼玉大・工, <sup>4</sup>EMRO

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、様々な微生物によって生分解されうる環境汚染物質である。PAHs 生分解の化学的および生物学的な理解は、PAHs バイオレメディエーション分野への応用や環境問題に対する解決策を与える手段としてだけでなく、石油由来の原料を再生可能なリグニンなどのバイオマス由来の芳香族化合物原料に代替するためにも重要である。今回我々は、液体クロマトグラフィー連結エレクトロスプレーイオン化タンデム式質量分析 (LC/ESI(-)-MS/MS) 装置を用いて、 $\alpha$ -Proteobacteria 綱細菌 *Sphingobium barthaii* KK22 株による PAHs の生変換の化学分析を試みた。その結果、多数の PAHs 生変換の代謝産物が検出され、これら代謝産物の包括的なマスのスペクトル解析および標準品のスペクトルの比較解析により、フェナントレンおよびナフタレンをスタート基質として用いた場合、芳香環がメタおよびオルト開裂される 2 つの分解経路が本菌株に存在することが示唆された。一方、本菌株のドラフトゲノムデータより 7 種の芳香環水酸化オキシゲナーゼをはじめとする複数の PAHs 分解関連物質の代謝に関与する遺伝子群を同定した。これらの代謝産物データおよび代謝遺伝子データから、フェナントレンおよびナフタレンでは 1,2-ジオキシナフタレンで代謝経路が合流することが明らかになった。今回の研究での定性および定量解析の結果、本菌株の PAHs の生変換過程において芳香環の開裂時に、メタおよびオルト開裂両方の経路が行われていることが明らかになった。本菌株が属する Sphingomonadaceae 科細菌は PAHs などの難分解性化合物を生分解および生変換することが知られている。この Sphingomonadaceae 科細菌において、2、3 環の PAHs においてメタおよびオルト開裂両方の経路が検出されたのは、本菌株が初めてである。本研究の成果と関連細菌との比較解析により、PAHs 生分解のメカニズムに対する理解が、より進展すると期待される。

## P-060

# ブタノール生産性*Clostridium*属細菌のゲノム情報に基づく 発酵代謝系の分子遺伝学的解析

○上原 研人, 秋山 真成美, 金本 美穂, 西澤 智康, 長南 茂, 新田 洋司, 久留主 泰朗, 太田 寛行  
茨城大・院農

E-mail: 15am202f@vc.ibaraki.ac.jp

バイオマスの有効利用方法の一つとして、*Clostridium*属細菌のアセトン・ブタノール・エタノール (ABE) 発酵が注目されている。これまでに、茨城大学フィールドサイエンス研究センターの畑地土壌からブタノール生産性*Clostridium beijerinckii* SBP2-HB株を分離し、スイートソルガム搾汁液 (SSJ) からバイオブタノールを生産することに成功している。SSJはスクロース、グルコース、フルクトースを含んでおり、カタボライト抑制によって、グルコースに比べて細菌のスクロース利用性が著しく低い点が課題であった。しかし、SSJに酢酸アンモニウム (AA) を添加することにより、スクロースの利用性が高まり、ブタノールの生産性も向上することわかってきた。そこで、本研究では、*C. beijerinckii* SBP2-HB株の糖類輸送系とABE発酵代謝に関わる遺伝子調節機構を明らかにするため、比較ゲノム情報解析に基づく*C. beijerinckii* SBP2-HB株の分子遺伝学的解析を行った。ゲノム解読されたブタノール生産性*Clostridium*属細菌 (*C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. saccharobutylicum*, および*C. saccharoperbutylacetonicum*) のABE発酵系の遺伝子をKEGGから取得して代謝経路を推定したところ、ピルビン酸からアセチルCoAの生成には*pflBD*, *por*, *korAB*の3遺伝子が存在し、クロトニルCoAからブチリルCoAの生成には*fabV*と*bcd*が関わる2経路の存在が示唆された。その先のブチリルCoAの変換は、ブタノール生成と酪酸生成に分岐するが、前者は*bdhAB*、後者は*buk*と*atoAD* (*C. acetobutylicum*ではプラスミドに存在) が触媒している。ABE発酵系遺伝子のゲノム中での所在 (染色体またはプラスミド) は菌種によって異なり、ABE代謝遺伝子の発現調節が異なることが推察された。一方、糖の取り込みには、特異性の無いホスホトランスフェラーゼ (PTS) システムのPtsS (*C. beijerinckii* NCIMB8052など) およびグルコース特異的なPTSシステムのPtsG (*C. acetobutylicum* DSM1731) が存在し、その相同性は低かった (Identity 31%, Similarity 76%)。SBP2-HB株では、AA添加条件でスクロース利用性が向上したことから*ptsS*が存在すると推察される。現在、AA添加培地における、これらの遺伝子の転写発現解析を進めている。



## P-061

### 深海環境から分離した細菌の分類学的研究

○宮崎 征行, 井町 寛之, 津留 美紀子, 酒井 早苗, 小林 徹, 出口 茂, 高井 研

海洋研究開発機構

E-mail: miyazakim@jamstec.go.jp

深海環境には超高熱性細菌（122℃で生育）や絶対好圧性細菌（大気圧では増殖できない）といった、普段我々が生活している環境からは想像し得ない場所に好んで生息している微生物が存在する。このように深海の微生物は陸上の微生物とは異なる性質を持つことから、新たな発見や未だ発見されていない性質や特徴を持つものとして期待されている。そこで我々は新たな培養手法を用いて、これら未知微生物の分離培養を目的として研究を行っている。本発表では、深海生物や海底下のコアサンプルから培養された2種類の細菌の菌学的特徴について発表を行う。

最初の分離株は富山湾の深海に生息しているオオグチボヤを分離源として分離した。本分離株の分離・培養には、寒天培地の代わりにナノファイバー構造のセルロース多孔質体を培地の固化成分とする新規固体培養法を用いた。このセルロースプレートに唯一の炭素源としてセルロースのみとなるように培地成分を染み込ませサンプルを播いたところ、細菌の増殖に伴いプレート表面に小さな穴が空き、微生物の増殖とセルロース分解能を有することが確認された。本分離株の系統学的位置は *Gammaproteobacteria* 綱, *Oceanospirillaceae* 科に属するが既知種とは16S rRNA 遺伝子の相同値が90%しかなく、新属新種として提案する予定でいる。

もう1つの分離株は2006年及び2012年に下北半島沖で地球深部掘削船「ちきゅう」を用いて採取され、海底下0.42 mbsfと1,900 mbsfの掘削コアサンプルからそれぞれ1株ずつ分離した。掘削コアサンプルの培養にはDown-flow スポンジリアクターを用いた。Down-flow スポンジリアクターとは、本来下水処理で用いてきた技術であるが、それを応用し、連続的に培地を流す事により目的の微生物をスポンジ上に繁茂させる集積培養装置である。分離した2株の相同値は99.9%で同種であると認められ、分子系統学的位置としては *Acholeplasma* 属に近縁ではあるが、既知種との相同値が92%であることから、*Tenericutes* 門に属す新科であると示唆された。

## P-062

# Total RNAseq 法による生物集団構造とメタトランスクリプトームの同時解析

坪井 亜里沙<sup>1,2</sup>, 井藤賀 操<sup>1</sup>, 本郷 裕一<sup>2</sup>, ○守屋 繁春<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理研 環境資源セ, <sup>2</sup>東工大 院 生命理工

近年の著しい次世代シーケンサーの能力向上は、生物学分野の研究手法を一変させた。特に発現遺伝子を対象としたRNAseqは様々な手法が考案されており、様々な生物学的問題の解決に役立っている。

本研究では、従来PCR法を用いて行われてきたリボゾームRNAによる微生物集団構造解析を、このRNAseq法を用いたマッピングベースの手法によって代替すると共に、従来は多量に含まれるリボゾームRNAに隠れて同時に解析する事が難しかったトランスクリプトーム情報をも同時に解析する事を目指した検討を行った。

草津地方の酸性温泉河川でサンプリングされた河床バイオフィルムをターゲットとしてtotal RNAを調製し、それを鋳型として全RNAのcDNAライブラリーを構築した。このcDNAライブラリーをIllumina社のMiSeqにてシーケンスを行い、得られたリードをリボゾームRNAデータベースであるSilva release 108のRepSeqデータベースをレファレンスとしてマッピングした。さらに、マッピングされなかったリードをアッセンブルしたうえでコード領域を推定し、これをトランスクリプトームデータベースとしてバックマッピングを行う事で発現遺伝子のパターンの推定を行った。

サンプリングを行った河川は上流と下流でpHが異なる事から、これらのサンプル間で発現相違解析（DE解析）を行ったところ、複数のリボゾームRNAおよび発現遺伝子で大きな発現変動が認められた。そこでそれらの配列について定量PCRによる配列の存在量の定量を行い、マッピングによる定量値との比較を行った結果、リボゾームRNA・発現遺伝子いずれにおいてもその発現パターンは定量PCRとマッピングによる定量値との間で同じパターンが認められた。このことから、本法は定量性の高い微生物集団構造解析手段として用いられると同時に、発現遺伝子のパターンの把握が可能である事が明らかとなった。同時に、全サンプリングポイントよりウイルスの遺伝子が発現遺伝子として検出されており、プランクトン集団の消長に重要な影響を持つとされているウイルスの同時定量にも道を拓くと考えられた。

## P-063

## GHOSTX を搭載した MAPLE 2.3 による生理・代謝機能ポテンシャルの評価

○荒井 渉<sup>1</sup>, 谷口 丈晃<sup>2</sup>, 竹本 和広<sup>3</sup>, 守屋 勇樹<sup>4</sup>, 五斗 進<sup>4</sup>, 高見 英人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>海洋研究開発機構・海底資源, <sup>2</sup>三菱総研・生活, <sup>3</sup>九工大・生命情報工学, <sup>4</sup>京大・化研

E-mail: w-arai@jamstec.go.jp

我々は、微生物、および微生物生態系の持つ機能ポテンシャルの解明を目的として、ゲノム・メタゲノム配列からの生理・代謝機能評価するシステム MAPLE (Metabolic And Physiological Potential Evaluator) を開発し、2013 年末から GenomeNet (<http://www.genome.jp/tools/maple/>) を通じて公開している。本システムが生理・代謝機能のデータベースとして用いている KEGG モジュールは、KEGG パスウェイマップをもとに定義されており、複数のオーソログ遺伝子 (KO: KEGG Orthology) から構成されている。MAPLE システムは個別ゲノム、環境メタゲノムなどから得られた遺伝子セットを対象として、KEGG モジュールへのマッピングおよび、そこから得られるモジュールの充足率 (MCR) に基づく生理・代謝機能の評価するツールである。この基本的機能に加え、MAPLE 2.3 では各代謝機能を担う生物種の割合、充足されたモジュールの abundance の違いに基づく代謝機能バランス、統計的有意性 (Q-value) についても評価を行うことが可能となった。したがって、本システムを用いることで、微生物コミュニティを構成するバクテリアとアーキアの比率や phylum レベルの生物種分類をはじめとして、環境中にある生理・代謝機能ポテンシャルとそれを担う微生物種、各機能の abundance などをハイライトし、異なる環境間での比較を容易に行うことができる。また、複数の大規模配列を用いる場合に問題となる計算時間に関して、検索エンジンを BLAST から GHOSTX に変更することにより以前と比べ約 1/2 以下まで短縮することができた。本発表では、Global Ocean Sampling project から公開されているサルガッソー海域及びガラパゴス諸島周辺海域の海洋メタゲノム配列 (各サンプルおよそ 120 万リード) を用いた比較機能解析を例として、MAPLE 2.3 の概念と使用方法、解析結果について報告する。

P-064

## 改良型MAPLEシステムを用いた太平洋低緯度海域のメタゲノム解析

○高見 英人<sup>1</sup>, 谷口 丈晃<sup>2</sup>, 荒井 渉<sup>1</sup>, 竹本 和広<sup>3</sup>, 守屋 勇樹<sup>4</sup>, 五斗 進<sup>5</sup>, 浜崎 恒二<sup>6</sup>

<sup>1</sup>海洋機構・資源, <sup>2</sup>東工大院・生命, <sup>3</sup>九工大院・情報, <sup>4</sup>情報システム機構・統合データ, <sup>5</sup>京大・化研, <sup>6</sup>東大・大気海洋研

E-mail: takamih@jamstec.go.jp

**【目的】**MAPLEは、KEGGモジュールの充足率(MCR)をもとに個別生物、微生物群集が持つ生理・代謝機能の評価を自動的に行う便利なシステムである。しかし、不完全なモジュールの機能評価やモジュールが充足された際の機能アバンダンス、その機能を担う生物種の多様性評価には対応できなかったため、改良型MAPLEシステムver. 2.1.0を開発した。本研究では、2011年から2012年にかけて南北太平洋亜熱帯域および赤道湧昇域への航海によって得られた複数のメタゲノム配列から、各海域の機能的な特徴づけを目的としてMAPLE ver. 2.1.0を用いた解析を行った。<sup>1)</sup>

**【方法】**白鳳丸による航海によって、南北太平洋と赤道域から得られた各3サンプルをサイズ分画により自由画分と付着画分に分けた計18サンプルを用いメタゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAからMiSeqにより配列決定された300塩基以上の (paired-end)100～250万配列をMAPLEに供試し、KEGGモジュールに対するMCR,アバンダンス、リボソームタンパク質に基づく菌叢組成などを算出した。また、各海域で測定された環境データとの相関関係を調べるため、MAPLEで得られた結果を説明変数、環境データを目的変数として正準相関解析(CCA)を行った。

**【結果】**改良型MAPLEによって得られた機能のアバンダンスや機能を担う個別生物種の種類や割合を指標に用いることで、これまでは同じと解釈されていたMCRが100%となる機能モジュールのポテンシャルにも海域ごとに差があることが浮き彫りになった。また、自由画分と付着画分の違いを説明するため、この2つの事象と環境データを目的変数として、各モジュールのアバンダンスを説明変数として、CCA用に行ったところ、種々のアミノ酸合成や鉄、ニッケルなどのトランスポーターが自由画分と、真核生物が持つ葉酸の代謝に関与するC<sub>1</sub>ユニット相互変換モジュールが付着画分と相関することがわかった。

<sup>1)</sup> Takami H., Taniguchi T., Arai W., Takemoto K., Moriya, Y., and Goto S. (2016) An automated system for evaluation of the functionome: MAPLE version 2.1.0. DNA Res. 1-9. doi: 10.1093/dnares/dsw030



## P-065

### 次世代シーケンサと培養法による細菌叢の比較

○福永 栄, 河西 英一, 上野 俊一郎

株式会社IHI

E-mail: sakae\_fukunaga@ihi.co.jp

近年、微生物の分子生物学的解析手法が発展し、培養法では検出できない系統を含む微生物群集構造が明らかになりつつある。しかし、代謝系など機能に関する情報を得にくい、PCR処理の過程で材料には実在しないキメラDNA配列が形成される等の課題も残っており、コロニーから菌を単離して生理学的性質を調べられる培養法も捨てがたい面がある。演者らは、再生可能エネルギーの一つとして期待されるバイオマス燃料のうち木質ペレットなど固体燃料の製造・供給において、燃料加工、保管等の過程で材料内部に内包される細菌叢の変遷を調べる機会を得た。この各工程のサンプルを破碎したのち次世代シーケンス(NGS)解析および培養法で調査し、細菌叢がどう変遷しているか、また二つの調査法による結果の違いについて考察した。方法の概要は以下のとおりである。1) NGS: DNA抽出後、341f-806rをプライマーに使用しPCR増幅を行い、次世代シーケンス装置としてMiSeq™ (Illumina, USA) を用い、16SrRNA 遺伝子のV3, V4領域をペアエンド法によりシーケンシングし、データベースRDP MultiClassifier ver.1.1で解析した。2) 培養法: R2A寒天培地で好気および嫌気条件下で形成されたコロニーのうち形態的に優占しているものからDNAを抽出し、PCR増幅、シーケンシング、テクノスルガ・ラボ微生物同定システムDBによる16SrDNA部分塩基配列解析を行って既知株との相同性を検索した。NGSの結果では、各サンプルに共通して優占している系統がある一方、より多様な系統を含むサンプルもあった。培養法で形成された12コロニーの相同性検索から推定された系統は、すべて、同じサンプルをNGS解析して得た主要な目に属していた。このバイオマス燃料の細菌叢については、次世代シーケンサ(NGS)解析結果と培養法の結果とが、整合していた。

## P-066

## 環境RNAを用いた微生物相解析：熱水活動域チムニーの場合

○武藤 久<sup>1</sup>, 高木 善弘<sup>2</sup>, 美野 さやか<sup>3</sup>, 宮崎 淳一<sup>2</sup>, 平山 仙子<sup>2</sup>, 澤山 茂樹<sup>1</sup>, 高井 研<sup>2</sup>, 中川 聡<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>海洋研究開発機構 深海・地殻内生物圏研究分野, <sup>3</sup>北海道大学大学院 水産科学研究院

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

深海底熱水活動域は、噴出熱水に含まれる化学物質を利用する化学合成独立栄養細菌を基盤にする独自の生態系を育むとともに、噴出熱水中に含まれる高濃度の金属成分は海底に大規模な熱水鉱床を形成することから大きな注目を浴びている。深海底熱水活動域に形成されるチムニーは、熱水中の鉱物などが析出した煙突状の構造物であり、その構造や鉱物組成・チムニー内外の環境は、噴出する熱水と周辺海水の影響を強く受け複雑に変動する。特に熱水・海水双方の影響を強く受けるチムニー表層域には、物理化学的に極めて多様かつダイナミックな環境が形成され、それに応じて多様な微生物が高密度に生息していると考えられている。実際過去に行われたチムニーに生息する微生物のDNAを用いた微生物相解析では、常温性から超好熱性まで極めて多様な微生物が同所的に優占して検出されている。しかしながら、それらの解析で検出された微生物が、本当に環境中で活動しているか、あるいは死菌や休眠細胞であるかは不明である。ダイナミックに変動する環境において活動的な微生物の種類や多様性を調べるには、RNAを用いた解析が有用であると考えられるが、深海底熱水活動域とくにチムニー表層域における微生物群集をRNAを用いて解析した研究例は大変少ない。そこで、まずチムニー表層に生息しているゴカイの巣（多様な微生物が生息することが知られ、サンプリングが比較的容易）からDNAおよびトータルRNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の増幅（必要に応じて逆転写）の後に次世代シーケンサーで解析した。その結果、DNAを用いた解析よりも、RNAを用いた場合において、中等度高熱菌や化学合成独立栄養細菌が優占して検出されるなど、環境中の微生物活動をより反映していると考えられる結果が得られた。次に、チムニー構造物の表層試料からRNAを用いた微生物群集構造解析を行うこととした。ところが、既存の様々なRNA抽出方法を用いたが、いずれも解析に必要な量と質のRNAを調整することができなかった。チムニーを構成する鉱物と培養微生物細胞を混合し、RNAが調整できなかった原因およびその対策について検討したので紹介する。



## P-067

### 超微量環境DNAからのメタゲノムライブラリー構築に関する技術的検討

○平井 美穂, 西 真郎, 津田 美和子, 高木 善弘, 布浦 拓郎

JAMSTEC

E-mail: m.hirai@jamstec.go.jp

メタゲノム技術は、微生物生態分野においてもはや汎用的な解析技術と言える。しかしながら、試料採取機会や採取量の限られた試料からメタゲノムを実施するにはいくつかの技術的課題が残されている。例えば、深海試料から回収されるDNAは極微量であることが多く、さらに夾雑物による酵素反応阻害、試料処理過程での生物学的コンタミネーションなどの影響により、汎用的な技術によるメタゲノムライブラリーの構築は容易ではない。

本研究において、我々は、核酸抽出方法、夾雑物除去、ライブラリー構築方法について検討を重ね、1ng以下の非常に微量な環境DNAより、Illumina社のMiSeqシステムを用い、メタゲノム解析を行うことに成功した。特に、ライブラリー構築においては、1ng以上のDNAからライブラリー作製可能である市販キット「KAPA Hyper Prep Kit」「Nextera XT DNA Library Preparation Kit」「Ovation SP+ Ultralow Library Systems」を対象に、ライブラリーを推奨濃度限界（1ng DNA）以下のDNAを起点としたメタゲノム解析を行い、得られたデータの質を比較検討した。

この結果、1ng以下の極微量DNAからライブラリーを構築した場合でも、シーケンスデータ中のPCR duplication readとcontamination read（ラボコンタミネーションと推測される微生物由来の配列）の割合が、データ解釈に影響しない程度までに抑えることが可能であることを示すことができた。また、異なるDNA量から構築したライブラリー間においても、全体的な微生物多様性や割合の傾向は類似していることを確認した。なお、本手法を超深海水塊、深海堆積物、海底下掘削試料に適応し、これまでに良好な結果を得ている。

## P-068

# 滑走性マイコプラズマ *Mycoplasma mobile* の運動機能解明に向けた大規模ゲノムクローニング

○大盛 佐和子<sup>1,2</sup>, 木村 信忠<sup>1,2</sup>, 柿澤 茂行<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大・院生命環境, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス

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

微生物は多数の遺伝子が連動して発現する機能を持っており、感染性・病原性・運動性・代謝能などが挙げられる。これらの機能を解明することは微生物学の発展に寄与すると考えられるが、多数の遺伝子を含む巨大ゲノム断片を扱う困難さゆえ、その手法は限定されていた。この問題の克服のため、本研究ではゲノムサイズが極めて小さく、全ゲノム移植に唯一成功した細菌であるマイコプラズマ属細菌の巨大ゲノム断片を操作する技術を確立することで、その機能を解明することを目的とした。材料としては滑走するマイコプラズマである *Mycoplasma mobile* を用いた。*M. mobile* の全ゲノムを酵母内にクローニングしたのち、それを滑走しないマイコプラズマである *Mycoplasma capricolum* へと移植し発現させることで、滑走運動に関わる遺伝子の特定と滑走機構の解明を目指す。そのために *M. mobile* の全ゲノムクローニング技術を確立した。クローニングのためのベクターは、酵母人工染色体 (YAC) ベクターに大腸菌の複製起点や選択マーカーなどを付与した。インサートに用いる *M. mobile* のゲノム抽出の際には、ゲノムの断片化を最小限に抑えるため、ゲルの中に包埋した菌体をプロテアーゼ処理により溶解することによってゲノムDNAを得た。その後、ベクターとマイコプラズマゲノムを酵母内に導入し環状化させた。形質転換後に得られた酵母のコロニーを用いて、ベクターとゲノムのつなぎ目部分のPCRを行い、導入したゲノムの存在を確認した。次に、マルチプレックスPCRにより、挿入断片上の複数の箇所を同時に増幅することで、挿入断片が *M. mobile* ゲノム由来の目的配列であることを確認した。さらにパルスフィールドゲル電気泳動を行い、ゲノムサイズを確認した。これらの結果、複数のクローンにおいて *M. mobile* の全ゲノム領域のクローニングに成功していると思われた。今後、クローニングした配列の全ゲノム Re-sequencing を行うことで塩基配列を確認したのち、*M. capricolum* へのゲノム移植を行う予定である。

## P-069

# GeneFISH法を用いて富士山地下水を対象に脱窒菌の機能遺伝子をシングルセルレベルで検出する試みII

○梶田 卓, 永翁 一代, 加藤 憲二

静岡大・院理

E-mail: masuda.suguru.15@shizuoka.ac.jp

[経緯] 継続的な窒素肥料の施肥によって引き起こされる地下水の硝酸汚染は人体に与える影響から問題視される。硝酸汚染を改善する方法として現場環境中の微生物による脱窒機能の活用が考えられる。脱窒を担う細菌の数を精確に見積もることは活性の推定に繋がり、更にはその活性を高める方策を考える手懸りとなるだろう。しかし、その機能を担う細菌は様々な分類群に亘って存在するため脱窒細菌の数の精確な定量は難しい。私たちは顕微鏡下で機能遺伝子を持つ細菌細胞をシングルセルレベルで検出する geneFISH法を脱窒細菌の亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS*へ適用することを試みている(第30回大会時には *Pseudomonas stutzeri*の *nirS*を約60%検出)。

[今回の進展] 硝酸汚染が確認される富士山地下水中の *nirS*を対象とした次世代シーケンシングを行い、地下水中の脱窒細菌群集を推定した。次にその中で優占した *nirS*に最も近縁な配列を持つモデル脱窒細菌を抽出し、geneFISHへの適用条件の検討を行った。geneFISH法ではプローブを透過させるための細胞壁処理が遺伝子検出のカギとなる(プローブ長は426 bp)。地下水中に存在する *nirS*の1つのクラスターを代表する *P. stutzeri*では細胞壁処理に proteinase Kが有効であり、*nirS*を持つ細胞を68.9%検出することに成功した。また *P. stutzeri*とは異なるクラスターを代表する *Paracoccus denitrificans*では zymolyaseを用いることで *nirS*を持つ細胞を15.9%検出した。さらに制限酵素によるプローブの断片化によって膜透過を容易にすることを試みた。断片化プローブを用いた geneFISHにおいても *nirS*を持つ細胞を検出可能であったが、その検出率は非断片化プローブよりも低い結果となった。断片化したことによりターゲットへの結合度合いに変化が生じたことが考えられる。

[今後の展開] 本研究において *P. stutzeri*の *nirS*を約7割検出することができた。地下水試料への geneFISHの適用にはさらなる検出率の向上が必要であり、細胞壁を破壊する酵素の検討やハイブリダイゼーション条件(ホルムアミド濃度や温度等)の調整が必要となるだろう。

## P-070

### PacBio RS II による完全長 16S rDNA 配列を用いた高解像度微生物群集構造解析

○佐藤 万仁<sup>1</sup>, 下地 真紀子<sup>1</sup>, 城間 安紀乃<sup>1</sup>, 照屋 邦子<sup>1</sup>, 安次嶺 典子<sup>1</sup>, 南 茉緯子<sup>1</sup>, 中野 和真<sup>1</sup>, 大木 駿<sup>1</sup>, 中西 哲大<sup>1</sup>, 新里 美寿々<sup>1</sup>, 保 日奈子<sup>1</sup>, 養王田 正文<sup>2</sup>, 池上 健太郎<sup>2</sup>, 會田 悠人<sup>2</sup>, 平野 隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>沖縄綜研・研究開発, <sup>2</sup>農工大・工

E-mail: kazuhito.satou@oias.or.jp

微生物群集構造を俯瞰するための方法として、次世代シーケンサーによる 16S rDNA 配列を用いた解析が広く普及している。次世代シーケンサーは、それが産出する膨大な配列データを背景とした網羅的な解析を提供するが、一方で、2つの潜在的な問題が存在していることに留意する必要がある。1つは、シーケンシング工程に含まれる PCR 増幅のバイアスに起因する菌種・菌数の偏りの問題であり、もう1つは、連続して読み取れるリード長が短いために 16S rDNA 配列のさらに一部の領域のみを利用せざるを得ないことに起因する分類・同定の解像度の問題である。16S rDNA 配列の全長は高々約 1,600 b であるが、これに対し次世代シーケンサーのリード長は数 100 b ほどである。また、次世代シーケンサーでは、リード長の短さをデータ量で補填するために内部的な PCR 増幅が必須となっている。PacBio RS II は、1 分子リアルタイムテクノロジーを実装した第 3 世代の DNA シーケンサーである。平均で >20 kb、最大で >60 kb という極めて長いリードを産出し、かつ 99.9% @ 10 x から 99.999% @ 30 x という非常に高いコンセンサス精度を有する。また、PCR 増幅を必要としないことから GC バイアスに無縁である。このため、PacBio RS II では、どのような生物種に由来する 16S rDNA 配列であっても偏りなくその全長を 99.9% 以上の精度で解読可能であり、本来の微生物群集構造を正しく反映した高解像度な解析を実現することが出来る。本大会では、同一の微生物群集を対象として、PacBio RS II による完全長 16S rDNA 配列を用いた解析と、一般に行われている MiSeq による 16S rDNA 配列 V3-V4 領域を用いた解析との比較を行い、それぞれの特徴などについて考察し発表する。

## P-071

## Construction of metagenome BAC library from mangrove soil using the incubation method

○ Sanghwa Park<sup>1,2</sup>, Naoya Shinzato<sup>1</sup>, Seikoh Saitoh<sup>1</sup>, Hiroaki Aoyama<sup>1,5</sup>, Junko Hashimoto<sup>3</sup>, Kazuo Shin-ya<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus,

<sup>2</sup>Technology Research Association for Next generation Natural Products Chemistry, 2-4-32 Aomi, Koto-ku, Tokyo Japan,

<sup>3</sup>Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), 2-4-7 Aomi, Koto-ku, Tokyo, Japan,

<sup>4</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-4-7 Aomi, Koto-ku, Tokyo, Japan,

<sup>5</sup>Center for Strategic Research Project, University of the Ryukyus.1 Senbaru, Nishihara, Okinawa

Polyketides are structurally and functionally diverse secondary metabolites that are biosynthesized by polyketide synthases (PKSs) using acyl-CoA precursors. Recent studies in the engineering and structural characterization of PKSs have facilitated the use of target enzymes as biocatalysts to produce novel functionally optimized polyketides. These compounds may serve as potential drug leads. In this study, we have attempted to obtain bacterial PKS gene clusters from mangrove soil metagenomic sample by employing bacterial artificial chromosome (BAC) library system and Type-I PKS primer screening method. To construct BAC library carrying metagenomic DNA, we incubated mangrove soil until 7 days with equal volume of 5 different liquid media (N=4). The microbial cells were collected after 0, 1, 3 or 7 days of incubation and then metagenomic DNA was extracted and purified for BAC library construction. Each metagenomic DNA sample was also analyzed for bacterial community structure by illumina sequencer and compared among the samples. As a result, the soil sample incubated with 1/10 Zobell medium for 1 day showed 2 times larger relative abundance of phylum *Actionbacteria* and *Verrucomicrobia* than initial mangrove soil. On the other hand, it was shown that the bacterial community incubated with 1/10 SN medium for 3 days was dominated by genus *Pseudoalteromonas* (30% relative abundance), while they were detected as minor fraction in the initial mangrove soil (<0.5%). This result suggests that our incubation method could be an efficient method to enrich metagenomic DNA for bacterial taxon of interest, because the phylum *Actinobacteria* or genus *Pseudoalteromonas* are widely known to produce various secondary metabolites. In addition, our incubation method enabled us to obtain more bacterial mass from mangrove soil and thereby more stable metagenomic DNA suitable for subsequent preparation of BAC library.



## P-072

## 寒天培地表面への微細凹凸形成による微生物の培養制御の試み

○内山 茂<sup>1</sup>, 磯島 隆史<sup>2</sup>, 伊藤 嘉浩<sup>2</sup>, 中村 振一郎<sup>1</sup><sup>1</sup>理研・中村特別研究室, <sup>2</sup>理研・伊藤ナノ医工学研究室

E-mail: s.uchiyama@riken.jp

【背景・目的】微生物を培養してコロニーを形成させる場合に用いる寒天培地は、通常表面が平滑である。この表面を微細な凹凸構造にした場合、コロニーの広がり方にどのような変化が生じるのかについて検討した知見はこれまで殆どない。本研究では表面構造による培養制御を目指して、表面に微細な凹凸構造を形成させた様々なシリコン型を作製してそれを寒天培地に転写することにより微細な凹凸表面構造を有する寒天平板を作製し、大腸菌、枯草菌、紅色光合成細菌および酵母菌のコロニーを形成させて平滑寒天培地表面におけるコロニーの形状と比較した。【方法及び結果】予備実験として、ハスやサトイモの葉などの天然素材や、目の粗さの異なるサンドペーパーやメッシュクロスおよびアルキルケテンダイマーによるフラクタル表面などを用いた。これらを直径9cmのプラスチック製ペトリ皿の底の片半面に貼りつけ、もう半面にはアクリル薄板を張り付けて、その上に高精細転写用シリコン印象材 (SIM-240、信越化学) を流し入れて減圧脱泡し、40℃で2時間硬化させた後に剥離して素材の表面形状を転写したシリコン型を作製した。寒天培地は一般細菌用としてトリプトソイ寒天培地、紅色光合成細菌用としてPE寒天培地、また酵母菌用としてYM寒天培地を用いた。枯草菌、大腸菌、紅色光合成細菌、酵母菌は、それぞれ $10^5$ CFU/mlに調整した懸濁液 $1\ \mu\text{l}$ を上記寒天培地に点接種して30℃で3～5日間培養してコロニーを形成させた。その結果、ハスの葉、サトイモの葉、アルキルケテンダイマーの表面構造を転写した寒天培地では平滑面に形成されたコントロールのコロニーと比べて明らかに小さくなった。一方、目開き $6\sim 24\ \mu\text{m}$ のメッシュクロスを転写した寒天培地ではコロニーが薄く速やかに広がる傾向が見られた。これらの結果から寒天培地表面を微細な凹凸にすることで微生物の増殖を制御できる可能性が示唆された。寒天培地表面の微細構造のサイズや形状が増殖に及ぼす影響を定量的に明らかにするため、ガラス基板に塗布したフォトレジスト (AZ1500) をフォトリソグラフィによって一定間隔でライン・スペース化した単純な凹凸構造パターンの原型を作製し、それを寒天培地表面に転写して、それぞれの微生物のコロニー形成や増殖速度への影響を検討している。結果は当日報告する。

## P-073

**自動計測による微生物のサイズ・形状評価  
—卓上型SEMを用いた微生物の解析—**

○尾崎 温美, 和田 祥子, 山崎 映明, 鍵 紀子

ジャスコインタナショナル株式会社

**【目的】**

走査型電子顕微鏡 (SEM) は、光よりも波長の短い電子線を試料に走査させ、放出される反射電子、二次電子等を検出することで試料の表面情報を得る手法であり、微生物の観察・計測にも用いられている。

微生物は、栄養状態等の外的要因や種類によってサイズ・形状が変化するため、SEMを用いてこれらを統計的に評価するためには、複数個体について観察・計測を行う必要がある。そのため、多くのSEM像を撮影し、更に、SEM像毎に写った微生物を一個体ずつ計測する必要があるが、観察対象とする個体数が多い場合や、長さ・アスペクト比といった様々なパラメータによる評価を行う際には、膨大な時間と労力が必要となる。

そこで我々は、SEM像の自動撮影機能を有する卓上型SEMと粒子解析用ソフトウェアを組み合わせることで、複数個の微生物を自動計測できるシステムを考案した。今回は納豆菌を用いて、異なる温度環境下でのサイズ・形状の違いの計測を試みたので報告する。

**【方法】**

[試料準備] 本実験には、市販の納豆を4℃にて2時間静置したものと、その後更に40℃にて2時間静置したものをを用いた。それぞれを固定化処理、TIブルー染色液 (日新EM社製) による導電処理を施した。染色液の洗浄後、豆の周囲にある粘着性物質を微生物捕集用フィルタ (孔径0.6  $\mu\text{m}$ ) に塗布し、超純水にて粘着性が無くなるまで洗浄し、フィルタごと導電コーティング処理を行った。

[微生物の検出] 測定にはフェノムワールド社製卓上SEMを用いた。自動撮影機能を用いて、8000倍以上の倍率で任意の範囲のSEM像を複数枚取得した。得られた各SEM像は、背景よりも明るい部分を粒子として認識する粒子解析用ソフトウェアであるパーティクルメトリックを用いて自動解析を行い、微生物の検出個数およびサイズ・形状に関する数値結果とヒストグラムを得た。

**【結果】**

卓上型SEMの自動撮影機能と粒子解析用ソフトウェアを組み合わせることで得られたSEM像から、数千個以上の納豆菌を自動で検出することができた。その結果、40℃にて静置した場合の方が4℃にて静置した場合よりも長いものが存在し、その割合は検出された納豆菌の1割程度であること、広いアスペクト比の分布をもつことが示された。このことから、微生物を自動的に計測し、多くの個体に対して短時間で様々なパラメータによる比較が可能となり、微生物の生態を解明する研究、生育状況の評価への応用が期待される。

## P-074

### w/o エマルションを利用したナノカルチャー技術の開発

○松倉 智子, 横井 妙子, 野田 尚宏

産総研・バイオメディカル

E-mail: matsukura-satoko@aist.go.jp

【目的】 w/o(water-in-oil) エマルションは油相内に水が粒子となって分散している分散系溶液である。w/o エマルションは近年、次世代シーケンサーのライブラリー作製やデジタルPCRなどに利用されている。これらの技術で利用されるw/o エマルションはナノスケールで作製される場合が多く、その微小反応場においてPCRなどの酵素反応を効率的に行うことができる。数万から数十万のエマルションを一度に作製し、その一つ一つのエマルションにおいて反応を行うことができるためハイスループットな反応場として活用されている。長時間安定的に形態を保持できるw/o エマルションを作製することができれば、ナノスケールの微生物培養器としての利用も可能である。本研究では、微生物培養用の培地を水相として選択し、それを油相に分散させたw/o エマルションを作製する。さらに、数日から数週間の長期にわたって安定的に保持できるようなw/o エマルションを利用したナノカルチャー技術の確立を目指す。確立したw/o エマルションナノカルチャー技術を用いて、大腸菌や土壌由来微生物の培養を行った。【方法】 水相に用いる微生物培養用培地としてはLB培地を選択し、油相に分散してw/o エマルションを作製した。LB培地の濃度を変化させて、作製されるw/o エマルションの安定性を評価した。さらに、大腸菌培養液や土壌由来微生物懸濁液を適宜希釈し、LB培地と混合したのちに油相に分散させてw/o エマルションを形成した。数日から2週間程度の培養後にw/o エマルションを観察し、微生物の増殖の有無を評価した。【結果・考察】 LB培地を水相として用いたw/o エマルションは1～2週間程度、安定的に保持されることがわかった。w/o エマルション内で大腸菌を培養できることもわかった。また、培養開始から1週間程度経過したw/o エマルションから大腸菌を回収し、LBプレートで再培養したところコロニーの形成を確認したことから、w/o エマルション内で培養した微生物を生きた状態で回収できることがわかった。土壌由来微生物を同様に培養した結果、複数のエマルションにおいて微生物の増殖を確認できた。w/o エマルションナノカルチャー技術はハイスループットなシングルセル培養技術として利用できることが示唆された。

## P-075

## 微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法

○植田 雄人<sup>1</sup>, Dawoon Jung<sup>2</sup>, Nil Tandogan<sup>3</sup>, Edger D Goluch<sup>3</sup>, 金田一 智規<sup>1</sup>, 大橋 晶良<sup>1</sup>, 青井 議輝<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>広島大・院工, <sup>2</sup>広島大・サステナセンター, <sup>3</sup>NortheasternUniversity

圧倒的多数の環境微生物は従来法では培養できない。これまでも微生物の獲得を目指した分離培養手法が考案されてきたが、その数は著しく少ない。それ故に、新しいコンセプトに基づく分離培養手法の開発は、従来の方法論に強く依存してきた今日の状況を打開する可能性がある。そこで、我々はナノメートルオーダーの成形技術を活用し、微生物の獲得に不可欠な、分離から培養までを自動的に行う分離培養デバイスを開発した。本研究では、環境微生物を自動的に分離し、培養するという新しいコンセプトに基づく分離培養デバイスを用いて、微生物を獲得する新規手法を開発すること、及び実環境サンプル（土壌）を本デバイスに適応し、分離培養が可能かを実証することを目的とする。本デバイスは培地が充填されているフードチャンバーと外環境へと繋がる細い管（ナノチャンネル）によって構成されており、環境中の微生物はナノチャンネル入口付近で増殖を始め、フードチャンバーに向かってナノチャンネル内を一系列に分裂しながら進み、最終的にフードチャンバー内で検出可能レベルまで増殖し、分離培養を可能にするという原理である。実験方法として、まず、本デバイスの入り口部位に土壌由来の環境サンプルを注入し、適宜顕微鏡を用いてフードチャンバー部位での微生物の増殖の可否を確認した。微生物が増殖していた場合、チャンバーから菌体を採取し、平板培養、液体培養法を用いて2次培養を行った。2次培養で菌体の増殖を確認した後、菌体を分離し、RFLP法によりチャンバーごとに菌体が単一種、あるいは複数種存在しているかを判断した。その後16S rRNA遺伝子のDNAシーケンス解析を行った。顕微鏡を用いて本デバイス内部を観察したところ、ナノチャンネル入口付近で集合する菌体、ナノチャンネル内部で分裂する菌体、及びフードチャンバー内での菌体の増殖を確認した。また、土壌中の複数の微生物から、ナノチャンネルを介すことで、獲得する分離株を2-3種類に限定して分離培養できた。さらに平板法との16S rRNA遺伝子に基づく比較解析において、平板上で出現した菌体と異なる種の獲得、並びに多様性の高い菌体を獲得した。このことから、新規手法を用いて土壌サンプルの分離培養に成功し、他の環境サンプルを本デバイスで獲得可能であることが示唆され、本手法は従来の方法論に代わる新たな分離培養手法として確立できる高い潜在性があると言える。



## P-076

# 病原性フザリウムの共培養による土壤病害の発病抑止性に関わる土壤生物性の評価法の検討

○三星 暢公<sup>1,3</sup>, 紀岡 雄三<sup>1</sup>, 野口 勝憲<sup>2</sup>, 浅川 晋<sup>3</sup>

<sup>1</sup>片倉コープアグリ株式会社 筑波総合研究所, <sup>2</sup>片倉コープアグリ株式会社, <sup>3</sup>名古屋大・院生命農

E-mail: masahiro\_mitsuboshi@katakuraco-op.com

作物の生産現場において土壤病害は収量低下の原因の一つである。中でも土壤伝染性フザリウムは被害を及ぼす作物の種類が多く、防除が困難である。一方で、土壤病害の発生が少ない発病抑止土壤が知られており、土壤理化学性以外に土壤生物性が抑止性の要因として考えられているが、土壤の発病抑止性に関わる実用的な生物性評価法はない。そこで、圃場における土壤病害の発生可能性の診断を目指し、発病抑止性に関する土壤生物性の評価方法を検討した。具体的には、希釈した土壤懸濁液と病原性フザリウムを共培養し、フザリウムの増殖程度を評価した。一般的に、希釈倍率が高くなると土壤懸濁液中の微生物数が少なくなりフザリウムが増殖しやすくなり、また、懸濁液中の微生物の種類によりフザリウムの増殖抑制程度が異なると考えられるため、本方法は土壤中の微生物数、活性、拮抗力を総合的に評価できると考えられる。

土壤を  $10^1 \sim 10^6$  倍に希釈した懸濁液を塗抹した寒天プレートの中央へ予めフザリウムを培養した寒天片を置き、一定期間培養後フザリウムの増殖程度を測定し、土壤懸濁液を接種しない場合と比較した。フザリウムの増殖程度の評価はコロニーの実面積、フザリウム寒天片からコロニーの外周までの伸長距離（最大・最小）及びコロニー全体を楕円と考えた場合の面積を計測することにより行った。コロニーの実面積と楕円で近似した面積により評価した場合、フザリウムの増殖程度に差はなかった。コロニーの伸長距離で評価した場合、実面積と比較して希釈倍率の変化に対する変動が緩やかであったため、希釈段階ごとのフザリウムの増殖程度の微細な変化をよりよく評価できると考えられた。

本方法により、有機質肥料によるフザリウムの増殖抑制程度を評価した。蒸製骨粉、牛糞堆肥（ソイールパワー 2号）、微生物資材（バイオ有機）では、牛糞堆肥と微生物資材がフザリウムの増殖を抑制した。次に、これらの資材を混合した土壤へ病原性フザリウムを接種し、ホウレンソウの栽培試験を行った。ホウレンソウの発病度に差がみられ、本方法により評価した栽培後土壤のフザリウム増殖程度とホウレンソウの発病度との間に有意な相関関係が認められた。

以上の結果から、本方法により土着の微生物によるフザリウムの増殖抑制程度が評価できると考えられ、発病抑止性に関わる土壤生物性を評価できる可能性が示唆された。



## P-077

東日本大震災の津波浸水による農地土壌微生物群集への影響の  
長期的解析

○浅野 亮樹, 早川 敦, 阿部 みどり, 志村 洋一郎, 小林 弥生, 稲元 民夫, 福島 淳

秋田県大・生資

E-mail: r-asano@akita-pu.ac.jp

東北太平洋沖地震の震央に近い地域で津波浸水した農地において、土壌微生物群集の解析を行い、近くの浸水を免れた土壌との比較を行った。土壌試料は宮城県東松島市内の浸水を免れた水田 (unflooded field: UF)、約2週間浸水した水田 (short term: ST)、約2ヶ月間浸水した水田 (long term: LT) から採取した。試料は津波浸水の1年後、2年後、3年後、4年後および5年後に採取した。土壌試料の物理化学的な分析を行うとともに、DNAを抽出し、真正細菌に特異的な8F/518Rプライマーを用いて16S rRNA遺伝子断片をPCR増幅、Roche GS junior次世代シーケンサー（秋田県立大学バイオテクノロジーセンター）を用いて配列を決定し、試料間の比較を行った。津波浸水から1年後には、STとLTはProteobacteria門の優占化、亜硝酸酸化細菌の割合の低下、硫黄酸化細菌、特に耐塩性の硫黄酸化細菌である*Halothiobacillus*属の増加が見られ、さらに海洋環境からのみ検出が報告されている*Mariprofundus*属がLTから検出された。また主座標解析の結果、STとLTは、UFとは明確に異なるクラスターを形成した。STは津波浸水から2年後には亜硝酸酸化細菌および硫黄酸化細菌の割合がUFと同程度になり、主座標解析では細菌群集構造についてUFとの違いが見られなくなった。しかし、LTの細菌群集は、非浸水土壌との違いは小さくなりつつあるが津波浸水から3年後にも異なる構造であり、4年後にも耐塩性の硫黄酸化細菌も検出され、硫黄酸化細菌が多い傾向が見られた。以上より、浸水した土壌の微生物群集は浸水期間や海水および底泥の供給量により異なった影響を受けると考えられる。現在これらサンプルの津波浸水5年後の細菌群集構造を解析中である。本研究は秋田県立大学学長プロジェクトでの援助を受けた。

## P-078

## 芳香族・脂肪族ポリエステルによる土壌微生物叢および植物成長への影響

○鈴木 美和, 室井 文篤, 橘 熊野, 小林 由紀子, 櫻井 喬典, 粕谷 健一

群馬大・院理工

【目的】脂肪族芳香族共重合ポリエステルであるポリ（ブチレンアジペート-co-テレフタレート）（PBAT）は、生分解性を有する高分子で、生分解性マルチフィルム材に用いられている。PBATは農業用途に用いられるため、PBATが土壌微生物叢に与える影響を評価することは重要である。本研究ではPBATの生分解に伴う周辺土壌の微生物叢への影響および植物の生育への影響について調べた。

【方法】PBATフィルムを埋設した土壌を30 °Cで好氣的に保持し、所定の時間ごとにフィルムおよび土壌を採取した。回収した土壌およびフィルム表面に付着した土壌から微生物のメタゲノムDNAを回収し、リボゾーマルDNA（rDNA）をターゲットとしてポリメラーゼチェーンリアクション-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（PCR-DGGE）法を用いて、土壌微生物叢解析を行った。さらにPBAT埋設土壌を用いて *Brassica rapa* var. *chinensis*（チンゲンサイ）の植物育成試験を行った。コントロールとしてフィルムを含まない土壌を用いて、微生物叢解析および植物育成試験を行った。【成績】3ヵ月後のPBATフィルム表面に付着した土壌試料中にのみ *Hyphomicrobium*属および *Caenimonas*属に近縁な種が存在していることがわかった。この結果から、3ヶ月間でPBATフィルム周辺の細菌叢が変化することがわかった。真菌をターゲットとした微生物叢解析の結果、7ヶ月後のフィルム表面に付着した土壌には子囊菌門に属する真菌類が存在していることがわかった。この結果から、7ヶ月間でフィルム周辺の真菌叢が変化することがわかった。土壌埋設試験7ヶ月後のコントロールを含む全ての土壌試料中で、植物病原性微生物が確認された。一方で、PBATフィルム表面および埋設土壌中には植物成長を促進する根圏細菌（PGPR）である *Azospirillum* および *Mesorhizobium*属も検出された。そこで、PBAT埋設土壌を用いて、*B. rapa* var. *chinensis*を栽培し、乾燥重量により生育度合いを評価した。その結果、PBAT埋設土壌およびコントロール土壌で生育した *B. rapa* var. *chinensis*の乾燥重量はそれぞれ0.089 gおよび0.076 gであり、PBAT埋設土壌は、*B. rapa* var. *chinensis*の生育に対して負の影響を及ぼさないことが示された。

【結論】PBATの埋設に伴いフィルム表面付近および埋設土壌中の微生物叢が変化することが明らかになった。一方、PBATの埋設に伴う土壌微生物叢の変化は植物の生育に負の影響を及ぼさないことがわかった。

## P-079

### 土のミクロ団粒内に見られる異形の細菌細胞群：その3 ナノ微生物？

○服部 黎子, 服部 勉

アチックラボ

E-mail: atic-tr@dd.ij4u.or.jp

土のミクロ団粒内部には、径数ミクロン以下の毛管孔隙が豊富に存在し、細菌など小型微生物の安定した居住空間として注目される。こうしたミクロ団粒の超薄切片を透過型電子顕微鏡により観察すると、さまざまな異形細菌像がみられることを、先の本学会大会（2014年,2015年）で報告した。それらはいずれも、人工培地で培養した通常の細菌細胞の形態とは著しく異なるものであった。この様な異形の細菌細胞群とは別に、土のミクロ団粒内には、通常の細菌細胞にくらべ、著しく微小な微生物様物体の存在がしばしば認められる。その大きさは200nmを下回り、その形態もさまざまである。微細なため内部構造は不明だが、ときには細胞分裂様の外観を呈することもある。同様な微小な微生物様物体は、1989年Folk(文献1)により鉱物表面で観察され、「nannobacteria (その後nanobacteriaと呼ばれる)」として報告された。その後、人体・岩石・海洋などでも、同様な「ナノ微生物」様物体が観察された。これらが「生物か、それとも鉱物微小結晶か？」をめぐる、盛んに議論されてきたが、現在なお決着をみていない。本報告では、透過型電子顕微鏡観察によりミクロ団粒中に認められたさまざまな「ナノ微生物」様物体の形状を示す。材料と方法 材料：東北大学川渡草地圃場、仙台市広瀬川霊屋橋付近沿岸から採取した土壌団粒。試料作製法：ミクロ団粒を0.1% glutaraldehydeで固定後、寒天内に包埋した。試料を含む寒天ブロックを1% osmium tetroxideで固定、2% uranyl acetateで処理脱水し、Epon 812に包埋した。電子顕微鏡観察：樹脂試料から超薄切片を作成し、2% uranyl acetateとsaturated lead citrateで染色後、日立EM, H-500を用い、75KVで観察を行った。結果 「ナノ微生物」様微小物体は、ミクロ団粒超薄切片で観察される一次鉱物のシルト片の面上や二次鉱物である粘土凝集体の切断面中に、多様な形態で単独、または群がって存在することが認められる。これらの微小体が、果たして「ナノ微生物？」かどうか、今後まず検討すべき課題である。文献1) Folk, Robert L. (1997). "Nanobacteria: surely not figments, but what under heaven are they?". *Natural SCIENCE*. Retrieved 2008-12-20.R.Folk 1989,

## P-080

### 新規有機物資材を用いた土壌還元消毒における細菌群集構造の変化

○李 哲揆<sup>1</sup>, 飯田 敏也<sup>1</sup>, 村元 靖典<sup>2</sup>, 渡辺 秀樹<sup>2</sup>, 中保 一浩<sup>3</sup>, 大熊 盛也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理研・BRC, <sup>2</sup>岐阜県農試, <sup>3</sup>農研機構・中央農研

E-mail: cholgyu.lee@riken.jp

トマト青枯病は植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる土壌病害である。現在、防除法として抵抗性台木の利用やクロルピクリンなどのくん蒸剤による土壌消毒などが行われているが、防除効果や環境に与える影響などが問題になっている。土壌還元消毒法とは土壌中に有機物を施用後、水を張り還元的な状態を保つことで好気性の病原菌を死滅させる消毒方法である。これまでフスマ等を利用した土壌還元消毒が利用されているが、圃場の深層部に分布する青枯病菌を消毒できないことから十分な防除効果は得られていない。我々はアミノ酸/核酸発酵副生物である糖化ケーキおよび糖蜜の新規資材を用いた土壌還元消毒の効果を検討するとともに、安定化基盤の確立のための土壌微生物群集構造の解析を行った。消毒は岐阜県農業技術センター内のビニールハウスにおいて、糖化ケーキ (2t/10a) および糖蜜 (0.6%) を圃場に混和、湛水 (150L/m<sup>2</sup>) 後、ビニールで3週間被覆することにより実施した (対照は無施用)。経時的に2つの深度 (17–33cm, 33–50cm) から土壌を採取し、DNAを抽出後、原核生物の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR増幅した。増幅産物はGS Juniorを用いてアンプリコンシーケンスによる菌叢解析に供した。また消毒期間中の青枯病菌密度は発病性の青枯病菌に特異的なプライマーを用い、DNAを希釈するMPN-PCR法を用いて見積もった。土壌抽出DNA量と青枯病菌密度は糖化ケーキ施用区で還元消毒実施後3日目に上層、下層ともに著しく減少していた。また糖化ケーキ、糖蜜吸着資材施用区では消毒後の土壌から青枯病菌がほとんど検出されなかったことから、本資材を用いることで土壌深層の消毒の有効性が確認された。菌叢解析の結果、群集構造は上層と下層で異なるものの処理区間での有意な差は見られなかった。一方、原核生物の多様性は消毒期間を通じてほとんど変化はなかったが、有機物施用後にはBacillalesが増え有機物分解に関与していることが示された。また青枯病菌の消長と負の相関を示す細菌種がいくつか検出され、これらの細菌は還元消毒に影響して、消毒成否の指標となると考えられた。



## P-081

## 土壌細菌群集によるリン可給化能の維持機構

○美世 一守<sup>1</sup>, 丸山 るな<sup>2</sup>, 齋藤 利仁<sup>2</sup>, 磯部 一夫<sup>1</sup>, 國頭 恭<sup>2</sup>, 妹尾 啓史<sup>1</sup>, 大塚 重人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東大・院農, <sup>2</sup>信大・理

E-mail: mise-33@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】土壌圏は、一般に可給態リンに乏しいことが知られている。このため、土壌微生物の生存・増殖には土壌中に多様な形態で存在する不可給態リンを利用する必要があり、土壌微生物群集には不可給態リンを可給化する機能が備わっている。こうした土壌微生物群集の機能は土壌圏におけるリン循環の中枢を担っているため、環境の変化に対して極めて頑強であると想定される。微生物群集機能の頑強性は生態系機能の維持の観点では重要なものだが、微生物資材の施与による土壌改良・施肥削減の障壁となることが指摘されている。しかし、この頑強性を担保する原理について検討を行うことで、そのような障壁をかわす方法を見出せる可能性がある。本発表では、頑強性の背後に存在する原理について(1)特定の菌群から成る可給化の担い手(キープレーヤー)の不存在(2)群集構造形成の偶然性と必然性の2点から検討する。

【方法】2種類の黒ボク土にC源・N源を添加し、リン制限条件のマイクロコズム系を構築した。これらの土壌マイクロコズムを1～24日の範囲で培養し、培養後の土壌について細菌群集構造(16S rDNA)・ホスファターゼ遺伝子*phoD*組成をAmplicon Sequencingで解析するとともに、土壌酵素活性(ホスファターゼ・ $\beta$ -グルコシダーゼ)ならびに理化学性を測定した。培養は、添加物質・培養期間の条件ごとに3 biological replicatesで実施した。

【結果と考察】(1)2種類の土壌いずれにおいても、個々の分類群の組成割合はホスファターゼ活性に連動しなかった。また、*phoD*の $\alpha$ 多様性は一定であり、16S rDNAの $\alpha$ 多様性やホスファターゼ活性との間に相関は見られなかった。したがって、ホスファターゼ産生を特別に担う「キープレーヤー」は存在しないと考えられる。(2)3反復間のばらつきは、酵素活性については一貫して小さかった(概ねSD<0.1)。他方、群集構造は3反復間で全く異なる場合と、ほぼ一致する場合の両方があった。反復間のばらつきは、攪乱直後における群集構造形成過程の一回性・偶然性(stochastic / neutral process)を示唆するものの、破壊系の3反復で十分な検証を行うのは難しいようである。もっとも、培養期間全体を通じた群集構造変遷の大局は、土壌の処理方法によらず類似していた。このため、長期的に見れば一定の必然性(niche-based process)を肯定することも可能であろう。



## P-082

# 土壌環境における *Burkholderia* 属細菌の生育段階と土壌高発現遺伝子の転写変動パターンの関係性

○田上 諒, 西山 依里, 大坪 嘉行, 永田 裕二, 津田 雅孝

東北大・院生命

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

細菌研究は主に実験室系で行われているため、細菌が実際の棲息環境でどのような生きざまをしているのかは未だ不明な点が多い。本研究では、モデル土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の土壌環境適応戦略を明らかにする目的で、IVET (*in vivo* expression technology) を用いて土壌特異的に発現する遺伝子を同定してきた (Nishiyama *et al.* Environ. Microbiol. 2010)。しかし、当該遺伝子が土壌での細胞の増殖・維持・死滅のどの段階で重要かはわかっていない。そこで本研究では、これら遺伝子の土壌での経時的な転写パターンを明らかにし、それを液体培養時の転写パターンと比較することにした。

滅菌土壌へ ATCC 17616 株を  $10^6$  CFU/g soil になるように植菌し、継時的に CFU 測定と RNA 抽出を行った。抽出した RNA は精製・逆転写後、IVET で同定されていた遺伝子の転写量を qRT-PCR を用いて解析した。同様の実験をコハク酸添加最小液体培地でも行い、土壌での場合と比較した。

土壌に植菌した ATCC 17616 株の CFU は、植菌後 1-2 日間の誘導期段階の後、3-4 日目で最大菌密度 ( $5 \times 10^8$  CFU/g soil) に達し、約 1 か月間維持したが緩やかな減少傾向が見られた。一方、検討した遺伝子の土壌での転写は、生育段階で異なっていた。例えば、フェニル酢酸分解初発酵素遺伝子の転写量は増殖初期に顕著に発現していたのに対して、アントラニル酸ジオキシゲナーゼをコードする *andAc* の転写量は菌密度が最大に達した時点で最大となり、それ以降徐々に減少した。また、土壌での *andAc* の転写は液体培養の場合と比べて、量的にも多いとともに生育段階での様式も異なっていた。*andAc* は土壌における増殖期から定常期に変化する時期に多く転写されていることから、利用しやすい炭素源が枯渇した際のエネルギー源として土壌に何らかの形で存在するアントラニル酸類縁物質を利用している可能性があった。現在、土壌における遺伝子発現の網羅的な解析を進めている。

## P-083

### 多環芳香族炭化水素の混在のなかで起こる *Sphingobium barthaii* sp.strain KK22 による生分解についての解析

○井澤 陽, カナリー ロバート

横浜市大・大学院

E-mail: n165252d@yokohama-cu.ac.jp

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は環境汚染物質として広く知られている。この PAHs は石油やクレオソートに代表される非水性な液体に含まれている。PAHs は多くの種類が存在するが、中でもベンゾピレン benzo[a]pyrene (BaP) は難分解性であり、生体にとって発がん性も示されている。しかし、この BaP の微生物による生分解については明らかになっていないことが多い。一方、BaP と同じく PAHs である phenanthrene (PHE) は特定の状況下において生分解できることが知られている。本研究では BaP と PHE が混在する状況下で生分解にどのような影響があるのかを調べた。

今回、BaP が PHE の生分解に及ぼす影響を知るために *Sphingobium barthaii* sp. strain KK22 (KK22) による生分解実験を行った。ガスクロマトグラフィー (GC) による定量解析の結果、48 時間の生分解実験において BaP と PHE が混在する培地では PHE の生分解が阻害されることが示された。さらに、LC-(-)MS/MS で定量解析を行った結果、BaP と PHE が混在する培地では 7 日間経過時に PHE のみの培地に比べて 10 倍から 100 倍多い濃度で PHE の代謝産物がサンプル内に残っていたことから、PHE の生分解が BaP によって妨げられていたことが明らかになった。

また、この研究で KK22 は PHE の共存に影響を受けずに BaP を生分解することができることが明らかになった。この BaP の生分解によって生じた 5 つの代謝産物を LC/ESI-MS/MS により解析し同定した結果、7,8-、9,10-dihydroxybenzo[a]pyrene の両方あるいは一方の中間代謝産物を経て、それぞれオルト開裂、メタ開裂が起こり 1(2)-hydroxypyrene-2(1)-carboxylic acids に代謝されることが示された。本実験により、PHE の生分解が BaP との競争的阻害によって妨げられることが結論付けられた。

## P-084

### 下水汚泥中に存在する難培養高度好熱菌に関する研究

○藤本 遼, 奥川 友紀, Kathrina Mae Ulilang Bienes, 砂掛 愛, 田代 幸寛, 酒井 謙二

九大院・生資環

E-mail: yytst685@gmail.com

#### [背景]

鹿児島市では、下水処理過程で生じる下水汚泥を80°C前後で進行する超高温堆肥化法によって堆肥に変換している。先行研究において、原料汚泥および堆肥より *Thermaerobacter* 属および *Calditerricola* 属の高度好熱菌が分離されているが、次世代シーケンサーによる網羅的な細菌群集構造解析結果では、高度好熱菌の存在比が非常に少ない (Tashiro et al., J Biosci Bioeng, in press)。よって、原料汚泥に生息する高度好熱菌の由来や超高温で堆肥化が進行する機構は不明である。本研究では、特に好熱菌に着目し、異なる条件で原料汚泥の高温集積培養を行い、細菌群集構造解析による高度好熱菌の調査を目的とした。

#### [実験方法]

鹿児島市で常温にて処理された原料汚泥（消化汚泥）を分離源とし、堆肥と CYS 液体培地を混合した培地を用いて異なる条件で高温（70-75°C）にて集積培養を行った。集積培養液から DNA を抽出した後、16S rRNA 遺伝子部分領域の PCR 増幅を行い、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) および MiSeq による細菌群集構造解析を行った。さらに、固体培地を用いて、高温集積培養液からの高度好熱菌の分離を試みた。

#### [結果]

DGGE 解析の結果から、同じ分離源を用いた場合でも集積培養条件により細菌群集構造が大きく異なることが明らかになった。また、DGGE 解析で最も多様であった集積培養条件下の主要細菌は、MiSeq 解析でも主要であったことから、両解析法により得られた結果に相関があった。さらに、高温で集積後200種以上の OTU が確認され、特に Firmicutes 門の存在比が高かった。以上のことから、常温で処理された消化汚泥中に多様な高度好熱菌が存在し、高温で集積可能であることが示唆された。さらに、集積培養液から高度好熱菌の純粋分離を試みたところ、固体培地ではコロニーの形成が確認できなかった。よって、集積された高度好熱菌は液体培地では増殖するが、固体培地で増殖できない難培養高度好熱菌であると考えられた。現在、これらの難培養高度好熱菌を純粋分離するために、顕微蛍光マニピュレータを用いた1細胞液系分離を試みている。

## P-085

## 茶園土壌に添加したササ・ススキの分解に伴う土壌理化学性と微生物群集構造の変化

鮫島 玲子<sup>1</sup>, ○園田 咲<sup>2</sup>, 浅井 辰夫<sup>1</sup>, 高橋 冬実<sup>3</sup>, 小杉 徹<sup>3</sup><sup>1</sup>静岡大・学術院農, <sup>2</sup>静岡大学・院農, <sup>3</sup>静岡県・農林技術研究所

E-mail: sameshima.reiko@shizuoka.ac.jp

【目的】静岡の「茶草場農法」は、茶草（ササやススキを中心とした草本植物）を茶樹の畝間に施用する。茶草場農法により生産される茶葉は高品質とされ、茶草の土壌改良効果や肥料効果が予想される。ただし、異なる種類の茶草は土壌に与える影響も異なることが懸念される。そこで本研究では、茶園土壌の理化学性と微生物群集構造に与える影響をササとススキで比較するため、実験室内で土壌培養試験を行った。【実験】茶園に設けた試験区のうち茶草 64 kg/10 a、化成肥料 40 kg-N/10 a を施用している区の畝間からサンプリングした土壌を用いた。1 L ポリビーカーに深さ 10 cm の土壌を詰め、含水比を 0.5 に調製した。これにササまたはススキ 25 g を加えてよく混合したササ区、ススキ区、茶草を加えないコントロール区の 3 種類を 3 連で作成した。25℃の暗室で培養し、適宜滅菌水を加えることで含水比を維持した。半年後、1 年後にそれぞれ茶草の分解率、最大容水量、無機態窒素量、可給態窒素量、微生物数を調査した。また 16SrDNA、18SrDNA を対象とした PCR-DGGE 解析を行った。【結果と考察】分解率は半年後、1 年後いずれもススキよりササが高かった。最大容水量は、コントロール区で減少し、ササ区、ススキ区では増加したが、ササ区でより大きく増加した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>量はどの区も半年で減少した。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>量は 3 区とも増加したが、生成した NO<sub>3</sub><sup>-</sup>量はコントロール区、ササ区、ススキ区の順に高かった。可給態窒素量もササ区・ススキ区でコントロール区より高かった。茶草施用は硝化を抑制し窒素の有機化を促進すると考えられた。細菌数はササ・ススキ区で半年後に急激に増加し、その後減少した。糸状菌数はササ・ススキ区で半年後に少し増加し、その後ススキ区で減少したが、ササ区で急激に増加した。コントロール区では細菌・糸状菌数いずれも減少した。微生物群集のクラスター分析では細菌・糸状菌群集とも、1 年後にコントロール区がササ・ススキ区とクラスターが分かれる傾向にあり、茶草区特有の群集構造が形成された。また糸状菌では、担子菌類（*Auricularia* 属）に相同性を示すササ区特有のバンドや、*Phialosimplex* sp. に相同性を示すコントロール区に特徴的なバンドが見られた。本研究室では窒素過剰施肥の茶園より脱窒活性の高い *Phialosimplex* 属近縁の糸状菌が分離されているが、茶草施用により増殖が抑制される可能性が考えられた。



P-086

## 比較プロテオミクスによるアラスカ永久凍土氷楔由来放線菌の 休眠状態の代謝生理解析

○池 晃祐<sup>1</sup>, 長倉 美琴<sup>2</sup>, 高須賀 太一<sup>3</sup>, 堀 千明<sup>1</sup>, 寺島 美亜<sup>4</sup>, 北川 航<sup>1,5</sup>, 加藤 創一郎<sup>1,5</sup>,  
曾根 輝雄<sup>3</sup>, 鎌形 洋一<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>北大院農, <sup>2</sup>北大農, <sup>3</sup>北大院食資源, <sup>4</sup>北大低温研, <sup>5</sup>産総研生物プロセス

E-mail: k-ike@chem.agr.hokudai.ac.jp

芽胞非形成バクテリアには環境ストレスに対応して「生存してはいるが増殖しない」状態、いわゆる休眠状態に陥るものがある。我々のグループはアラスカの楔状に発達した永久凍土層から新属新種の芽胞非形成放線菌 *Tomitella biformata* AHU1821<sup>T</sup> を単離し、本菌を人工的に休眠状態へ誘導可能であることを見出した。このような休眠状態が水中での長期生存に関与していると考えられているが、その分子機構は不明である。本研究では休眠の代謝生理の解析を目的とし、本菌株の休眠および増殖細胞を用いた比較プロテオーム解析を行った。休眠細胞の調製は次のように行った。液体栄養培地で前培養した *Tomitella* 菌体を生理食塩水で2度洗浄した後、フルクトースを加えた液体最小培地に OD<sub>600</sub> が 0.01 となるよう接種した。本培養は 30 mL 容バイアルチューブに 20 mL の培地を添加し、チューブの口をブチルゴム栓で覆う酸素制限状態で行った。溶存酸素濃度がほぼ 0 になるまで振盪培養した後、静置に切替えて培養を続けた。本手法で約 2 か月静置して得た休眠細胞と通常の好気的な対数増殖期細胞からビーズ式細胞破碎によって全タンパク質を抽出し、質量分析によるプロテオーム解析に供した結果、休眠細胞からは 2,003 タンパク質、対数増殖期細胞から 2,135 タンパク質が検出・同定された。そのうち約 250 個のタンパク質は休眠・増殖条件で有意に発現強度が異なっており、その中には中枢代謝関連タンパクも多く含まれていた。解糖系の酵素群はその多くが休眠条件で高発現していた。一方 TCA 回路の酵素群は、上流・下流の酵素群こそ休眠条件で高発現がみられたものの、2-オキソグルタル酸脱炭酸酵素の発現が非常に低く抑えられていた。この結果は、TCA の酸化サイクルは機能しておらず、嫌気性代謝でよくみられるオキサロ酢酸からコハク酸への還元反応が進行していることを示唆する。また呼吸鎖電子伝達系のタンパク質群では、通常使われる末端酸化酵素であるシトクロム c 酸化酵素の発現が休眠条件で低下し、高い酸素親和性を持つシトクロム bd 型キノール酸化酵素の発現が上昇していた。またグルタミン酸シンターゼなどアミノ酸生合成に関わる酵素発現量は低下しているものが多かった。以上の結果から、本来偏性好気性である本菌は休眠状態において、アミノ酸合成などの同化的代謝を低下させ、嫌気型に近いエネルギー代謝を活性化させることで生命を維持しているものと考えられる。



P-087

## 土壌細菌の多様性の標高変化に対する土壌特性と植物多様性の相対的重要性

○執行 宣彦<sup>1</sup>, 平尾 聡秀<sup>1</sup>, 梅木 清<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東大・秩父演習林, <sup>2</sup>千葉大・院園芸

E-mail: shigyo@uf.a.u-tokyo.ac.jp

**【目的】** 森林における土壌細菌群集の標高変化を理解することは、地球温暖化などの環境変動に対する有機物分解速度や物質循環の変化を予測するのに役立つ。これまでの研究から、土壌細菌群集の標高変化は温度や土壌特性に依存することが明らかにされてきた。一方、植物は落葉落枝や根滲出物を土壌に供給するため、植物と土壌微生物の多様性の間には関係があることが知られている。本研究では、土壌細菌の多様性が、土壌特性だけでなく、標高に伴う植生変化、特に樹木の種多様性と機能的多様性の変化から強く影響を受けているという仮説を立て、土壌細菌の多様性を規定する要因を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 東京大学秩父演習林の天然林において、標高傾度（900 m～1800 m）に沿った60ヶ所の調査区（30 m 四方）を設置し、植生調査と土壌採取を行った。2014年5月下旬から6月上旬に、深度ごと（0～5 cm・5～10 cm・10～20 cm・20～30 cm）に土壌を採取し、真正細菌の16S rRNA 遺伝子V4領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析、および土壌特性（pH・EC・含水率・CN比）の分析を行った。また、調査区に出現する樹木種については、各種3～5個体の葉を採取し、機能特性として比葉面積・総フェノール・CN比を測定した。これらのデータから、土壌細菌のOTU数および調査地間のOTUの入れ替わりと、土壌特性・樹木の種多様性・樹木の機能的多様性との関係を調べるために、重回帰分析を行った。

**【結果】** 土壌細菌のOTU数は土壌深に伴って減少し、深度0～5 cmおよび5～10 cmで標高と有意な負の相関を示した。また、標高と樹木の種多様性には有意な負の相関が見られた。土壌細菌のOTU数に対する重回帰分析の結果、特に5～10 cmの深度において、葉のCN比の多様性が土壌pH・EC・樹木の種多様性より強い相関を示すことが明らかとなった。また、調査地間の土壌細菌のOTUの入れ替わりに対しても同様の解析を行った結果、深度0～5 cmでは土壌特性の違いに比べて、樹木種の入れ替わりが強い正の相関を持っていることが明らかとなった。これらの結果から、標高に沿った樹木の種多様性と機能的多様性の変化によって、表層土壌の細菌群集が形成されていることが示唆された。さらに、深度10～20 cmおよび20～30 cmでも、土壌細菌のOTU数と樹木の機能的多様性に相関が見られ、樹木の機能特性が細菌群集を規定していることが示唆された。

## P-088

## 不耕起栽培畑地土壌における耐水性団粒の微生物群集メタゲノム解析

○中根 麻冴美<sup>1</sup>, 雫田 麻衣<sup>1</sup>, 西澤 智康<sup>1</sup>, 小松崎 将一<sup>1</sup>, 橋本 知義<sup>2</sup>, 太田 寛行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>茨城大・院農, <sup>2</sup>農研機構中央農研

E-mail: 16am206h@vc.ibaraki.ac.jp

不耕起栽培は、気候変動を緩和する土壌炭素隔離につながる可能性があるため、近年関心が高まっている。土壌の炭素隔離能は、耐水性団粒の含有量と関係していることや、団粒は土壌微生物や土壌有機物にとって安定な環境を提供していることが指摘されてきた。しかし、耐水性団粒を微生物学的に特徴付ける研究はまだ十分にはなされていない。そこで、本研究では、分子遺伝学的手法を用いて、農地土壌管理に関連する耐水性団粒内の微生物群集構造を分析することを目的とした。供試土壌は、茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター内の試験区（耕耘方法2水準（耕起／不耕起）、夏季ダイズ・冬季裸地、無施肥区を3反復で設定：2003年より継続的に耕起/不耕起管理）の表層0-10 cmから採取した。採取は播種後（2015年8月）、収穫後（同11月）、裸地期間中（2016年1月）に行った。土壌団粒（耐水性団粒）は水中篩別法を用いて、粒径2-8 mm, 0.25-2 mm, 0.1-0.25 mm, <0.1 mmの4画分を調製した。なお、<0.1 mmの画分は遠心処理で回収しているため、水中で粒子から遊離した微生物も含まれた。微生物群集構造は、各画分試料からDNAを抽出し、細菌16S rRNA及び菌類のITS領域を標的としたPCR-末端制限断片長多型（T-RFLP）解析を行った。さらに、細菌16S rRNA遺伝子のアンプリコンシーケンスのメタ解析を行った。耐水性団粒のサイズ組成は、粒径2-8 mm団粒の割合が不耕起区土壌では安定して高く（約30%）、耕起区土壌では季節変動が見られた。対照的に、粒径0.25-2 mmの団粒の割合が耕起区土壌で高かった。T-RFLP解析から、不耕起区土壌の細菌及び真菌類の群集構造は、耕起区土壌とは明確に異なった。さらに、16S rRNA遺伝子のメタ解析では、全ての粒径画分において、不耕起区土壌の方が耕起区土壌よりも細菌群集の多様性が高かった。不耕起区土壌において、粒径の異なる団粒中の細菌群集を網レベルで比較すると、<0.1 mmの画分では*Proteobacteria*と*Actinobacteria*が増加する傾向にあり、不耕起区における団粒サイズと細菌群集には関連があると推察された。耕起区土壌では、8月から11月にかけて、粒径0.1-0.25mmの画分で*Proteobacteria*の割合が増加し、*Acidobacteria*が減少する傾向が見られた。以上より、耕起／不耕起という農法の違いは、耐水性団粒の粒径サイズの経時的変化や団粒内の微生物群集の構造と動態に影響を与えることが示唆された。

## P-089

# 春期ブルーム中の親潮黒潮移行域において活発に細胞分裂する細菌群集 (Active growing bacteria: AGB) の組成比較

○片岡 剛文<sup>1,2</sup>, 山口 晴代<sup>2</sup>, 桑田 晃<sup>3</sup>, 河地 正伸<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福井県大海洋, <sup>2</sup>国環研, <sup>3</sup>東北水研

E-mail: kataoka@fpu.ac.jp

従属栄養性細菌は溶存態・粒子状有機物を利用して群集を維持しているため、バイオマスプールとして生物地球化学的な物質循環における重要な構成要素である。細菌の群集組成は海域や環境により異なるが、植物プランクトンの現存量との関係が知られており、特に、特定の系統群が植物プランクトンのブルーム時に優占する例が報告されている。近年では次世代シーケンス法により細菌群集組成を網羅的に分析できるが、天然群集には死菌や休眠状態の細菌も含まれており、物質循環に貢献するような活発に細胞分裂する細菌 (Active growing bacteria: AGB) についての知見は未だ少ない。プロモデオキシウリジン (BrdU) はチミジン類似体であり、細胞分裂に伴って複製される DNA に取り込まれるため、新たに合成される DNA の標識となる。つまり BrdU を取り込ませた環境試料から免疫沈降法により BrdU を含む DNA を選抜すること (BrdU immuno capturing: BIC) で、AGB 由来の DNA を分析可能である。本研究では、AGB 群集組成と植物プランクトンとの関係を明らかにするために、春期ブルーム中の親潮域と非ブルームの親潮黒潮移行域において、2 水深 (表層とクロロフィル極大) の細菌群集組成を 16S rDNA のアンプリコン解析により比較した。BIC 法により選抜されたゲノム DNA 中の 16S rDNA コピー数は、無選抜ゲノム DNA の 5 ? 10% を占め、全細菌群集の 10% 程度が AGB であることが示唆された。3 連反復実験で共通して得られた OTU を分析したところ、365 OTU (92% 相同性) が得られた。OTU 組成は表層とクロロフィル極大層でよく類似したが、親潮域では Alphaproteobacteria と Flavobacteriia に属する多様な系統群が優占し、移行域では Rhodobacteracea が優占する違いがあった。得られた OTU の 27% が AGB であり、優占する AGB の分類群は各観測点の無選抜細菌群集と類似していたことから、AGB と非 AGB は遺伝子型レベルで異なることが示唆された。また、親潮域の AGB は他海域の植物プランクトンブルームで優占する系統群と類似しており、ブルームに特異的な組成である可能性が示唆された。

## P-090

## RNA-seq データを活用した真核微生物群集構造の解明に向けた取り組み

○矢吹 彬憲<sup>1</sup>, 浦山 俊一<sup>2</sup>, 高木 善弘<sup>3</sup>, 西 真郎<sup>2</sup>, 横川 太一<sup>2</sup>, 荒井 渉<sup>4</sup>, 平井 美穂<sup>2</sup>, 藤倉 克則<sup>1</sup>, 布浦 拓郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>海洋研究開発機構・多様性, <sup>2</sup>海洋研究開発機構・生命理工, <sup>3</sup>海洋研究開発機構・Sugar, <sup>4</sup>海洋研究開発機構・海底資源

E-mail: yabukia@jamstec.go.jp

真核微生物は地球上の幅広い環境に生息し、様々な生態系において重要な役割を担っている。光合成性真核微生物（微細藻類）は、シアノバクテリアとともに外洋域における重要な一次生産者として生態系を支える存在であり、また従属栄養性の真核微生物（原生動物や原虫類）も微生物ループにおける重要な構成要員であることが広く認識されている。海洋環境の変化が叫ばれ、またその持続的な利用が課題とされている現在において、海洋生態系構造を正確に理解することは重要な研究課題であり、海洋環境中における真核微生物の多様性や存在量、および環境中での役割のより正確な理解が待たれている。これまで真核微生物を対象とした群集構造解析は環境DNAを用いた解析が主流であった。本解析方法では、幅広い系統に属す真核微生物の存在を網羅的に検出することが可能であり、また存在量が少ない真核微生物の存在も検出できるという利点がある。実際に様々な環境において環境DNAを利用した解析が進められ、真核微生物の多様性や各種環境における真核微生物相に関する理解が大きく進んだことには論を俟たない。その一方で、マーカー遺伝子配列を環境DNAよりPCR法により増幅させる過程でその増幅効率に種ごと／グループごとに偏りが存在する可能性も指摘されており、各真核微生物の存在量の比較や得られた配列量に基づく環境中での機能・役割の推定には障害があることも知られていた。今回、我々は北太平洋の北緯約47度の4地点（それぞれ、東経160.0218°, 166.7472°, -179.4263°, -151.4048°）において海洋表層水を採集し、それぞれにおいてRNAの抽出と次世代シーケンサーによる網羅的な配列収集を行った。得られた配列情報中からrRNA遺伝子配列を抽出し、それぞれの資料中に含まれる真核微生物相の推定を行った。また、得られたrRNA配列のリード数に着目し、各環境中におけるそれぞれの真核微生物の存在比の比較も行った。発表では、RNA-seqデータに基づく群集構造解析の利点や今後の展望についても議論したい。



## P-091

## 微細藻類由来の溶存態有機物が沿岸性海洋細菌群集組成に及ぼす影響

○多田 雄哉<sup>1,3</sup>, 中谷 理愛<sup>2</sup>, 後藤 周史<sup>2</sup>, 山下 洋平<sup>3</sup>, 鈴木 光次<sup>3</sup><sup>1</sup>JAMSTEC, <sup>2</sup>北海道大・院環境, <sup>3</sup>北海道大・院地球環境

E-mail: yuya.tada@jamstec.go.jp

海洋微細藻類由来の溶存態有機物 (DOM) は、海洋細菌の生物量や群集組成を変動させる主要要因とされ、DOM を介した両生物間の相互作用は、海洋生態系および DOM 動態を理解する上で重要である。本研究では、微細藻類から抽出した DOM のアミノ酸組成比および蛍光特性を明らかにすると同時に、抽出 DOM 添加に対する沿岸性海洋細菌群集の動態を明らかにすることを目的とした。珪藻 *Thalassiosira weissflogii* CCMP1336 株および渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* CCMP449 株を培養し、集藻後、細胞を破碎し、微細藻類抽出 DOM を得た。抽出 DOM 中のペプチド態および遊離態アミノ酸組成比をニンヒドリン HPLC 法によって、また、蛍光特性を三次元励起蛍光スペクトル法により解析した。これらの抽出物質を北海道忍路湾表層から採取した天然海水に添加し、微細藻類由来 DOM 添加に対する細菌群集構造・多様性の変動、さらに、微生物変化に伴う蛍光性 DOM の変化を解析した。珪藻および渦鞭毛藻抽出 DOM 中のアミノ酸組成比および DOM の蛍光特性は、2 種の藻類間で違いが見られた。16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 法および Ion Torrent を用いた細菌群集構造解析の結果、珪藻と渦鞭毛藻由来の DOM 添加では細菌群集の構造および多様性に与える効果が異なっていた。群集構造の変化は、渦鞭毛藻由来 DOM 添加区で大きく (コントロール区に対して 50.4%)、これらの変化には主に *Rhodobacteraceae* が寄与していた (15.4%)。また、珪藻由来の DOM 添加区では、主に *Rhodobacteraceae*、*Alteromonadaceae*、*Flavobacteriaceae* が変化に寄与していた (それぞれ 11.1%、8.8%、5.7%)。培養前後の蛍光性 DOM の変化として、渦鞭毛藻抽出 DOM 添加区では、全てのタンパク質様および腐植様物質由来の蛍光強度が減少したのに対し、珪藻抽出 DOM 添加区では腐植様物質の蛍光強度が上昇した。本実験の結果から、微細藻類由来 DOM の変化が海洋細菌群集構造・多様性の変化を起こすこと、また、これらの変化に伴って海水中の蛍光性 DOM 組成が変化することが明らかとなった。



## P-092

### 超閉鎖性内湾の季節的な貧酸素化にともなう水柱細菌群集の組成変化

○鷺尾 昂祐<sup>1</sup>, 東 健太郎<sup>1</sup>, 山喜 邦次<sup>1</sup>, 森 郁晃<sup>1</sup>, 梅澤 有<sup>1</sup>, 近藤 竜二<sup>2</sup>, 和田 実<sup>1</sup>

<sup>1</sup>長大院水環, <sup>2</sup>福井県立大・院海洋

E-mail: bb53116031@ms.nagasaki-u.ac.jp

【背景と目的】溶存酸素濃度 (DO) は水圏生物の増殖と生残に関わる重要な因子であり、水圏生態系の物質循環に大きな影響を与える。しかし、内湾の季節的な貧酸素水塊形成にともなう微生物群集の組成や活性変化について知見は乏しい。本研究では超閉鎖性内湾として知られる長崎県の大村湾において、貧酸素水塊形成期の水柱細菌群集の組成変化を明らかにし、同海域の物質循環に関わる微生物学的な知見を得ることを目指した。【方法】2015年5～9月に大村湾中央部 (水深21 m) を観測し、表層、中層および底層 (水深1 m, 11 m, 20 m) で採水した。試料由来の環境DNAを鋳型としMiSeqを用いた16S rRNA遺伝子配列のTagシーケンス解析を行った。配列データをMothur (Schloss et al. 2009) および、統計ソフトRのveganパッケージ (Oksanen et al. 2007) で解析した。【結果】大村湾中央部の水柱細菌群集構造は貧酸素期と通常期で異なる傾向が見られた (ANOSIM, Global R = 0.257, p = 0.086)。観測期間中、*Alphaproteobacteria* のSAR11 cladeがすべての採水層で最も優占していた (平均OTU存在比 = 72.7%, n = 12)。貧酸素化初期 (6月) の底層水中において、SUP05として知られる*Gammaproteobacteria* の硫黄酸化細菌系統群のOTU存在比は通常期の0%から8%に増加し、*Chloroflexi* のSAR202 (0→1%) および *Deltaproteobacteria* の *Myxococcales* (0→0.1%) の存在比もそれぞれSUP05と同様に6月の底層水中で増加した。【考察】大村湾における貧酸素水塊の形成に伴い水柱の細菌群集構造は変化した。通常酸素期との差は必ずしも明瞭ではなかった。しかし、大村湾の水柱におけるSAR11 cladeの優占や、貧酸素水塊形成初期のSUP05の増加は、超閉鎖性内湾においても外洋性の酸素極小層と共通した細菌群によるエネルギー代謝が卓越する可能性を示唆している。

## P-093

# 真核微生物ラビリンチュラ類の細胞外プロテアーゼプロファイル ～水圏での有機物分解者としてのポテンシャルを探るために～

○大林 由美子<sup>1</sup>, 高尾 祥丈<sup>2</sup>

<sup>1</sup>愛媛大・CMES, <sup>2</sup>福井県大・海洋生物資源

E-mail: obayashi.yumiko.nn@ehime-u.ac.jp

### 【はじめに】

ラビリンチュラ類は水辺の落葉などに付着してその有機物を分解することが知られており、その分解に、セルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼなどの有機物分解酵素を用いることがわかっている。しかし、水圏、特に水柱における溶存有機物や懸濁粒子態有機物の分解は、主に従属栄養性原核微生物による働きと認識されており、ラビリンチュラ類に代表される腐食性真核微生物の働きはほとんど解明されていない。一方で、外洋を含む幅広い海域からラビリンチュラ類の存在が報告されており、水圏での有機物動態におけるラビリンチュラ類の働きに興味を持たれる。本研究では、ラビリンチュラ類の水圏での有機物分解者としてのポテンシャルを探るための第一歩として、ラビリンチュラ類分離株を用いて液体培地中での細胞外プロテアーゼ活性プロファイル調べた。

### 【方法】

ラビリンチュラ類ヤブレッツボカビ科の主要 10 属 18 株について、対数増殖期および定常期に、細胞懸濁液と培養上清のそれぞれで、17 種類のオリゴペプチド MCA 基質（アミノペプチダーゼ用 5 種、トリプシン用 10 種、キモトリプシン用 2 種）の分解活性を測定し、各株のプロテアーゼプロファイルとした。

### 【結果と考察】

全株で、アミノペプチダーゼ型およびトリプシン型の細胞外プロテアーゼ活性が確認された。キモトリプシン型活性は *Botryochytrium* 属でのみ顕著だった。同じ属の株同士では似たプロファイルが見られ、属間では異なっていたことから、属により分解の得意な有機物が異なる可能性が示唆された。

対数増殖期には、アミノペプチダーゼ活性は、いずれの株でもほとんどが細胞を含む画分に検出されたが、トリプシン型活性は、20-90%程度（株によって異なる）が上清画分に検出された。すなわち、対数期のラビリンチュラ類は、アミノペプチダーゼを細胞表面の ectoenzyme として持つ一方、トリプシン型酵素の一部を水中に放出していると考えられる。

定常期には、対数増殖期に比べて細胞あたりの活性が低下する株が多いが、顕著に高くなる株も確認された。また、上清画分の活性の割合がやや高くなる傾向があった。これが、細胞破壊による細胞内酵素の漏出によるものか、生細胞からの放出によるものかは明らかではないが、いずれも水中の有機物の分解に貢献するものと考えられる。

以上より、ラビリンチュラ類は水柱でも有機物分解に貢献しうるポテンシャルがあることが明らかとなった。

## P-094

## 真核生物ラビリント類による珪藻からの栄養摂取

○浜本 洋子<sup>1,2</sup>, 本多 大輔<sup>2,3</sup><sup>1</sup>甲南大・院・自然科学, <sup>2</sup>甲南大・総合ニューロ研, <sup>3</sup>甲南大・理工・生物

E-mail: d1622001@s.konan-u.ac.jp

ラビリント類は、世界中の海洋に広く生息している従属栄養性の直径10  $\mu\text{m}$ 程度の単細胞真核生物であり、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。実際に河口域などではバクテリアの1.6%の炭素量バイオマスとして豊富に存在することが示され、陸源有機物や植物プランクトンの死骸などのデトリタスを栄養源としていることが推察されている。しかしながら、河川の影響をほとんど受けない海域にも存在していることから、重要な一次生産者である珪藻に着目し、ラビリント類の沿岸域の環境中での栄養摂取について検討を行った。まず、系統的に多様なラビリント類と、世界中で観察される珪藻である *Skeletonema* の二員培養を行った。その結果、すべてのラビリント類が、珪藻が死滅していない段階から増殖し、特に *Aplanochytrium* 属では、他の系統群と比較して顕著な細胞数の増加が確認された。また、*Aplanochytrium* 属が、*Skeletonema* の細胞に仮足状の外質ネットと呼ばれる構造を付着させた時に、急速に *Skeletonema* の葉緑体の色や形態が変化する様子が観察された。すなわち、死滅した珪藻を分解する場合にはバクテリアなどと競合するが、*Aplanochytrium* 属は細胞状態が良好な珪藻からも、直接に栄養摂取できること、また、空間に放射状に展開する直径100  $\mu\text{m}$ 以上の外質ネットを用いることで、細胞周辺のみより広い範囲の珪藻を栄養摂取の対象にできることが示唆された。*Aplanochytrium* 属は、一般的な有機物の培地ではあまり増殖しないため、これまでは特に注目されてこなかった。しかしながら、世界中の海洋の18S rDNA調査を行ったTara Oceansのデータを解析したところ、ラビリント類の中での配列数の比率は上位となることが多く、環境中ではラビリント類の主要群となっていると考えられた。さらに、Damare & Raghukumar (2010: MEPS 399: 53-68) は、in situ ハイブリダイゼーション法によって、*Aplanochytrium* 属が、ペルシャ湾のヤムシ類の腸管などにも存在することを示している。これらのことから、*Aplanochytrium* 属を中心とするラビリント類が、一次生産者から動物プランクトンへの新たに認識される着目すべきエネルギー転送経路をつないでいることが推察された。

## P-095

## 沖縄トラフ伊平屋北及び駿河湾の光合成微生物群集に対する熱水性鉱石からの溶出成分の影響

○坪井 隼<sup>1</sup>, 越川 海<sup>2</sup>, 淵田 茂司<sup>2</sup>, 山口 晴代<sup>1</sup>, 河地 正伸<sup>1</sup><sup>1</sup>国環研・生物セ, <sup>2</sup>国環研・地域セ

E-mail: tsuboi.shun@nies.go.jp

近年、日本周辺海域では海底金属鉱床の発見が相次ぎ、将来の資源開発・利用が期待されている。一方、海底金属資源の掘削・回収過程で開発現場及び周辺海域に生じる可能性のある重金属汚染によって、海洋の基礎生産者である光合成微生物群集への直接影響や高次栄養段階への重金属の生物濃縮が懸念される。我々は、次世代海洋資源調査技術（海のジパング計画）の生態系調査・長期監視技術開発課題において、掘削回収鉱石の海上漏洩事故発生を想定し、鉱石からの溶出成分が海洋の光合成微生物群集（真核藻類及びシアノバクテリア）に与える影響を評価した。

実験では、沖縄トラフ伊平屋北及び伊是名海穴熱水域で過去に採取された5種類の熱水性鉱石のうち、複数培養株を用いた増殖阻害試験において最も強い増殖阻害効果を示したG06鉱石（黄鉄鉱が主体）由来の溶出液を用い、沖縄トラフ伊平屋北サイト（かいいいKR15-17航海、2015年11月）のクロロフィル極大層（Chl-Max）（水深80 m）及び駿河湾サイト（KR15-20航海、同年12月）の表層から採取された海水の光合成微生物群集への影響を調べた。

次世代シーケンサーによるSSU rDNAのアンプリコンシーケンスの結果、KR15-17 Chl-MaxとKR15-20表層の光合成微生物群集の組成は異なり、前者は真核藻類ではプラシノ藻、シアノバクテリアでは*Prochlorococcus*、後者は珪藻及び*Synechococcus*の割合が高かった。G06溶出液（最終濃度0.2%）の曝露試験の結果、両サンプルで光合成微生物の細胞数は経時的に減少した。またパルス変調蛍光による潜在的な光合成活性（Fv/Fm比）測定の結果、G06添加系でFv/Fm比が漸減した後、培養後期で回復する現象が確認された。SSU rDNAの転写産物を用いて、培養後期に活性のある光合成微生物群集の組成を比較解析した結果、G06添加系では両サンプルでプラシノ藻及び*Synechococcus*の検出率の減少、一方で*Prochlorococcus*の増加が見られ、培養後期のFv/Fm比の回復現象における*Prochlorococcus*の関与が示唆された。

以上より、熱水性鉱石の溶出成分は海洋の光合成微生物の総生物量に負の影響を与え、種に応じた感受性の差異により光合成活性を支配する微生物群集組成を変化させる可能性が示された。



## P-096

## 培養条件によるラビリンチュラ類が分泌するセルラーゼ活性と外質ネットの形態の違い

岩田 いづみ<sup>1,2</sup>, ○本多 大輔<sup>2,3</sup><sup>1</sup>甲南大・院・自然科学, <sup>2</sup>甲南大・統合ニューロ研, <sup>3</sup>甲南大・理工

E-mail: d1422001@s.konan-u.ac.jp

ラビリンチュラ類は海洋に普遍的に存在し、陸域の菌類に相当する海洋における真核生物の分解者である可能性が示唆されている。ラビリンチュラ類は仮足状の外質ネットで基質に付着し、セルラーゼなどの分解酵素を分泌することで、生育環境中の有機物を分解吸収して栄養摂取を行っていると考えられている。一方、外質ネットの微細形態は、ラビリンチュラ類に特徴的な形態であるボスロソームを介して細胞体と隔てられ、ネット内部にはタンパク質の合成の場となるリボソームがないなど、他の生物の仮足と比べて非常にユニークである。そこで、外質ネットでの分解酵素分泌機構の解明をめざし、これまでに明らかにした外質ネットに存在するアクチンに着目して、本研究では、培養条件によって異なるセルラーゼ活性状態となった時の、外質ネットの形態とアクチンとの関係性について観察を行った。

*Schizochytrium aggregatum* を異なる基質の含まれた培地で培養し、セルラーゼ活性をCMCとコンゴレッド染色による検出法によって測定した。その結果、生育する培地によって、同じ株でもセルラーゼの活性状態には差があり、細胞の個体数の多い培地、あるいは海藻や海草類と培養した際に高い活性を示した。そこで、これらの培地でのセルラーゼ分泌の経時的な活性の変化を測定すると、海藻や海草類では、培養初期から高いセルラーゼ活性を示すことが明らかになり、細胞は特定の基質を認識し、セルラーゼの分泌を活性化している可能性が考えられた。同時に、異なる活性状態での外質ネットの形態にも差が観察され、特に、基質に付着している外質ネットでは、太い外質ネットと、強いアクチンの局在が観察された。また、蛍光グルコースとの培養実験から外質ネットから栄養源であるグルコースを吸収することが可能であることを見だし、特に基質存在下ではグルコースの取り込みが活発になることが分かった。これらの結果から、外質ネットは、分解酵素の分泌だけでなく、状況に応じて基質の認識や、栄養の吸収といった様々な機能を持つ可能性が考えられ、そうした様々な機能の変換に伴い、外質ネットの形態も変化していると考えられた。



## P-097

### カレニア・シャットネラブルーム細菌分画のメタゲノム解析

○北村 徳一<sup>1</sup>, 池尾 一穂<sup>1</sup>, 石野 良純<sup>2</sup>, 田代 康介<sup>2</sup>, 久原 哲<sup>2</sup>, 増田 健<sup>3</sup>, 中村 洋路<sup>4</sup>, 安池 元重<sup>4</sup>, 藤原 篤志<sup>4</sup>, 長井 敏<sup>4</sup>, 小林 敬典<sup>5</sup>, 五條堀 孝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>遺伝研, <sup>2</sup>九大院・農, <sup>3</sup>三重県水産研究所, <sup>4</sup>水研セ中央水研, <sup>5</sup>水研セ本部

E-mail: nkitamura@nig.ac.jp

渦鞭毛藻類のカレニア属 (*Karenia*) やラフィド藻類のシャットネラ属 (*Chattonella*) による赤潮は、養殖魚類の大量斃死をもたらすことで知られており、近年では2009年と2010年に九州地方でシャットネラ赤潮の大規模発生が起き、大きな被害が生じた。我々は、これら有害赤潮の原因生物のブルームとその前後の細菌動態を明らかにすることを目的として、海水中の微生物DNAを抽出し、分類群及び遺伝子機能の存在量を調べた。2015年夏季の英虞湾において小規模なカレニア・シャットネラブルームを含む時系列のサンプル（2地点から週毎のサンプリングを8回、計16サンプル）が得られた。これらの採水サンプルは8、1、0.2 μm フィルターでろ過され、捕捉した試料からDNAを抽出した。主に自由生活性の細菌が捕捉された0.2 μm フィルター試料を対象に、Illumina Miseqによるショットガンシーケンスを行った。得られたリードはNCBI-NRデータベースに対して相同性検索を行い、アノテーションを付与した。ブルームの有無、及び採水地点に基づいたサンプル間の比較を行ったところ、それぞれ細菌群集の構成に違いが生じていることが判明した。一方、遺伝子機能については、ブルームの有無に基づいたサンプル間に相対量の違いは生じていないが、採水地点に基づいた比較では違いが存在していることが示された。これら植物プランクトンのブルームと細菌群集の動態との関連について議論する。

## P-098

## 培養株から見えてくる淡水圏の浮遊細菌の特徴とその生態

○渡邊 圭司, 池田 和弘, 柿本 貴志, 見島 伊織, 高橋 基之

埼玉県・環科国セ

【目的】淡水圏の浮遊細菌には、世界中の湖沼や河川に普遍的に見られるクラスターが存在し、これらは淡水圏の物質循環において重要な役割を担っているものと考えられる。我々は、これまでに試水を平均粒子保持径 $0.7 \mu\text{m}$ のガラス繊維フィルターでろ過し、ろ液をR2A培地から糖質を除いた培地MR2A培地に塗抹し、 $27^\circ\text{C}$ で培養する方法で (SEAM)、日本の様々な湖沼や河川から未培養グループを含む多種多様な浮遊細菌群を分離培養することに成功してきた (PnecA、PnecB、PnecC、PnecD、GKS98、LiUU-5-340、IRD18C08、LimA、LimC、Luna1、Luna2および*Flavobacterium* spp.など)。本研究では、これまでに得られた浮遊細菌の分離株を用いて、低温条件 ( $5^\circ\text{C}$ ) での増殖特性、pHがアルカリ域 (pH9.6) や通常の培養条件 (pH7.2、MR2A培地、 $27^\circ\text{C}$ ) で増殖速度の比較検討、炭素源および窒素源の資化性試験等を行い、それぞれの浮遊細菌の分離株の特徴を調べることで、近年急速に普及している網羅的遺伝子解析では得られ難い、それらの生態に係わる基盤データを集積することを目的とした。

【結果】Betaproteobacteria綱に属する浮遊細菌は (PnecA、PnecB、PnecC、PnecD、GKS98、LiUU-5-340、IRD18C08、LimAおよびLimC)、炭素源として有機酸に強く依存しており、糖質やアミノ酸はほとんど資化しなかった。低温条件 ( $5^\circ\text{C}$ ) では、LimA、LimC、PnecC、LiUU-5-340に属する細菌が良好な生育を示し、低水温期にこれらの細菌群が優占する可能性が示唆された。GKS98に属する細菌は、中性域 (pH7.2) よりもアルカリ域 (pH9.6) で速い増殖速度を示した。PnecCおよびIRD18C08クラスターに属する細菌は、硝酸態窒素を唯一の窒素源として生育することが可能であり、この特徴が、河川においてこれらの細菌群が高頻度に検出される理由の一端であると推察された。

【謝辞】本研究の一部は、科学研究費助成事業 (若手研究 [B]15K16122) の助成を受けて遂行したものである。ここに記して謝意を表す。

## P-099

### 淡水湖沼より分離した新規好酸性細菌の特徴づけ

○岡本 怜, 小島 久弥, 福井 学

北大・低温研

E-mail: r.okamoto@pop.lowtem.hokudai.ac.jp

Acidocella 属は 1995 年に提唱された Alphaproteobacteria 綱 Rhodospirillales 目 Acetobacteraceae 科に属する細菌群である。Acidocella 属の細菌として、これまでに 3 種が正式に記載されている。これらの他、多くの研究が報告されている“Acidocella aromatica”が知られている。この属に含まれる細菌は酸性土壌や鉱山排水などの酸性環境に広く存在しており、既知の種は全て好酸性かつ中温性の従属栄養細菌である。本研究の目的は Acidocella 属に属する新規好酸性細菌 Ok2G 株の系統的・生理生化学的特徴付けを行うことである。Ok2G 株は北海道千歳市に位置する淡水湖沼の湖水を接種源とした酸性・好氣的条件下の集積培養系から得られた。菌株の純化作業は限界希釈法を用いて行った。Ok2G 株の 16S rRNA 遺伝子解析の結果では最近縁種である“Acidocella aromatica”と 97% の配列相同性を有することが示された。系統樹上において Ok2G 株は Acidocella 属の他の種から独立した位置にあることが示された。Ok2G 株の増殖可能な pH 域は 3.0 – 6.0 で、増殖可能な温度域は 4 – 35℃であった。Ok2G 株の細胞は幅 0.6 – 0.8  $\mu\text{m}$ 、長さ 1.0 – 2.8  $\mu\text{m}$  の短桿状で、運動性はなく、グラム染色性は陰性であった。Ok2G 株のカタラーゼ活性は弱陽性で、オキシダーゼ活性は陰性であった。グルコースやスクロースなどの糖類に加え、ピルビン酸、エタノール、メタノールなどを炭素源及びエネルギー源として利用した。“Acidocella aromatica”は安息香酸を含む芳香族化合物を広く利用することが知られているが、Ok2G 株では安息香酸を利用しなかった。以上の結果より、Ok2G 株が Acidocella 属における新たな種を代表する細菌であることが示唆された。

## P-100

### **Analysis of microbial community of red snow from alpine snowfields**

○ Mia Terashima, Kazuhiro Umezawa, Shoichi Mori, Manabu Fukui

Inst. Low Temp. Sci., Hokkaido Univ.

E-mail: m.terashima@lowtem.hokudai.ac.jp

As the temperature rises in the spring and summer of polar and alpine environments, green, orange and pink coloration paint the snowfields. Psychrophilic microalgae cause such coloration in the snow, making use of the window of opportunity where conditions are sufficient for growth, followed by mating and returning to a resting state to survive extreme conditions such as high light, freezing conditions and desiccation. Along with algae, heterotrophic bacteria are known to co-habit such psychrophilic ecological niche in an interconnected metabolic network where algae presumably provide the bacteria with fixed carbon and bacteria recycle nutrients back into the environment. Algae photosynthesize and fix carbon, of which gets released into the environment, supporting heterotrophic bacteria growth, while bacteria recycle elements back into the environment and can also provide algae with crucial nutrients, such as vitamins, or signals important in the life cycle of algae. Although algae coloring snowy peaks have been observed for many years, the community dynamics and cellular processes of organisms in such environments are understudied. In order to further understand the community dynamics of snow algae and bacteria, colored snow from Mount Asahidake (Hokkaido) was collected over three time points in June and July, 2016, for physicochemical, community sequencing and culture-based analyses. Both red and green-orange colored snow patches were observed, and upon analysis, stark differences in the photosynthetic activity and community profile these two types of snow emerged. Furthermore, the microbial community profile of the red snow also shifted over time. Preliminary data on bacteria associated with these snow algal species from culture-independent and ? dependent methods will be presented.

## P-101

### 多摩川上流の河床礫上バイオフィームに優占する好気性光合成細菌

○広瀬 節子, 松浦 克美, 春田 伸, 花田 智

首都大・院生命

E-mail: s-hirose@tmu.ac.jp

【目的】好気性光合成細菌は酸素を発生しない光合成細菌の仲間で、好気条件でのみ増殖及びバクテリオクロフィル合成を行う細菌のグループである。我々はこれまでの研究で、多摩川上流の河床礫バイオフィームに系統的に多様な好気性光合成細菌が分布していることを培養法で示してきた。本発表では、河床礫バイオフィーム中に優占する好気性光合成細菌を 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析から推測したので報告する。

【方法・結果】河床礫バイオフィームを採取し、DNA を抽出した。illumina 社のプロトコルに従い 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅し、MiSeq により配列決定した。低品質配列及びキメラ配列を除去後、Local BLAST を用いてデータ解析した。2012 年 7 月に採取した試料から 65253 リードの配列が得られ、その中から既報の好気性光合成細菌の配列を検索したところ、*Tabrizicola aquatica* に近縁な単離株 W19 と 100% 一致する配列が 10059 リード (15.4%) を占めることがわかった。本株およびその類縁株は、我々のグループによって、これまでに同地点の河床礫バイオフィームから分離されており、好気条件でバクテリオクロフィルを生産すること、嫌気条件で生育しないことを確認している。本菌の近縁種は *T. aquatica* (16S rRNA 遺伝子塩基配列類似度 98.8%) であるが、*T. aquatica* はバクテリオクロフィル生産能のない非光合成細菌であり、W19 株は *Alphaproteobacteria* の *Rhodobacteraceae* 科に属する新規好気性光合成細菌と考えられている。この株は富栄養培地では増殖せず、貧栄養培地 (有機物量が 1 L 中に 0.5g) でのみ増殖する特徴を有していた。

さらに、同地点において採取した別の河床礫バイオフィームについても同様に解析したところ、好気性光合成細菌のなかでは本菌が最も多く、5-8 万リードのうち 0.6-2.5% を占めていた。

【結論】好気性光合成細菌は水圏に広く、ある程度の存在比で分布することが知られている。南太平洋の水深 100m で細菌の 24%、9 月のスペインの河川水で 14%、夏の高山湖の湖水でバイオマス 50% 以上という高い報告もあるが、河床バイオフィームにおける優占度及び優占する好気性光合成細菌の報告はなかった。本研究で上流河川の河床礫バイオフィームにおいて低栄養性の新規好気性光合成細菌が多く分布することが示された。また本菌が 15% を超えて検出されたことは、同環境での生態的な重要性を示唆している。



## P-102

印旛沼の微生物ループにおける *Limnohabitans* 属の生態学的役割○三角 恭平<sup>1</sup>, 春日 郁朗<sup>1</sup>, 栗栖 太<sup>2</sup>, 古米 弘明<sup>2</sup><sup>1</sup>東大院・工、都市工, <sup>2</sup>東大院・工、附属水環境制御研究センター

E-mail: misumi@env.t.u-tokyo.ac.jp

沼内の有機物動態として、溶存有機物を起点とした水圏食物連鎖である微生物ループに注目が集まっている。しかし、この食物連鎖に関与している細菌群の実体については十分に明らかになっていない。そこで本研究では、千葉県印旛沼を対象として、微生物ループを構成する細菌群の探索を行なった。2014年10月、2015年6月、10月、2016年1月に印旛沼の表層水を採水し、孔径10  $\mu\text{m}$  でろ過したもの（湖水<sub>10</sub>）、細菌捕食性の原生生物を除外するために湖水<sub>10</sub>を孔径0.8  $\mu\text{m}$  でろ過したもの（湖水<sub>0.8</sub>）、無菌状態にするため湖水<sub>10</sub>を孔径0.2  $\mu\text{m}$  でろ過し加熱滅菌したもの（無菌湖水）をそれぞれ調製した。初期全菌数が湖水の1/10になるように無菌湖水に湖水<sub>10</sub> (Run A)、湖水<sub>0.8</sub> (Run B) をそれぞれ植種し、採水時の水温で暗所培養した。全菌数をフローサイトメーターで計数し、培養前後の微生物群集構造を16S rRNA遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンシングにより解析した。いずれの時期においても、原生生物による捕食圧が残存するRun Aでは、全菌数が増加した後に減少する様子が観察された。一方、捕食圧を除外したRun Bでは、増加した全菌数は一定のまま推移した。全菌数の最大比増加速度、最大比減少速度を算出した結果、それぞれ0.85-2.2 (1/day)、0.17-1.1 (1/day)であった。最大比増加速度と最大比減少速度との間には正の相関がみられ、特に低水温時に両速度とも値が低くなることが明らかになった。全菌数の推移とアンプリコンシーケンシングの解析結果より、細菌群別の増加量と減少量を推定した。その結果、いずれの時期でもBurkholderiales目の細菌群が、全菌数増加分の40-58%を、全菌数減少分の49-68%を占めていることが示された。また、すべての試料において、増加・減少したBurkholderiales目の中でも*Limnohabitans*属に近縁な同一のOTUが優占していた。このことから、異なる時期においても、特定の細菌群が微生物ループにおいて生態学的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## P-103

## 国内の大水深淡水湖に生息する細菌群集の網羅的分析

○岡崎 友輔<sup>1</sup>, 藤永 承平<sup>1</sup>, 田中 敦<sup>2</sup>, 高津 文人<sup>2</sup>, 大八木 英夫<sup>3</sup>, 中野 伸一<sup>1</sup><sup>1</sup>京都大学生態学研究センター, <sup>2</sup>国立環境研究所, <sup>3</sup>日本大学文理学部

日本は地形の変化に富み、世界的にも珍しい、大水深淡水湖(水深50～200m以上)を豊富に有する国土を持つ。大水深の湖では湖底まで光が届かないため、春～秋にかけて海洋と同様に温度躍層が発達する。琵琶湖・摩周湖・猪苗代湖・本栖湖といった国内の多くの大水深淡水湖では、成層期間中も温度躍層以深が有酸素に保たれ、好気・低温・無光の水塊(好氣的深水層)として維持される。この好氣的深水層は、湖の体積の過半を占め、表層の一次生産由来の有機物の貯蔵・分解の場として機能している。したがって、そこに生息する細菌群集は、湖全体の物質循環・生態系において重要な役割を担っていると考えられる。

アメリカのCrater Lakeや五大湖、アルプス山系の淡水湖、および琵琶湖で報告されてきた先行研究の断片的な情報を総合すると、好氣的深水層には、表水層で見られる一般的な淡水産系統(*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*)とは門レベルで異なるユニークな細菌系統が生息していると考えられる。しかし、網羅的な情報が存在しないことから、好氣的深水層に生息する細菌系統に関する統一的な見解は未だ得られていない。そこで本研究では、2015年夏に国内の10の大水深淡水湖で鉛直的に採集したサンプルを用いて、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスおよびCARD-FISHによる細菌群集組成解析を行い、好氣的深水層に生息する細菌系統に関する網羅的な知見を収集した。

その結果、北海道の摩周湖から鹿児島島の池田湖まで、幅広い環境の湖を対象としたにも関わらず、好氣的深水層に共通して生息する系統が多数特定された。総じて、好氣的深水層の細菌群集は「全水層で優占するジェネラリスト」と「深水層スペシャリスト」で構成され、スペシャリストでは特に、1系統の*Chloroflexi*(CL500-11)と多様な*Planctomycetes*(CL500-3, -37, -15等)が多数を占める傾向が見られた。FISHの結果は、アンプリコンシーケンスで得られたパターンと概ね一致し、全細菌に占める割合(FISH/DAPI)で見ると、CL500-11は10湖中3湖で15%を超える高い現存量を示し、CL500-3, やCL500-37でも現存量が3%を超える湖があった。本研究により、淡水湖の好氣的深水層をニッチとする主要な細菌系統の特定に成功した。今後は、大水深淡水湖を豊富に有する日本の地の利を生かし、個々の系統に焦点を当てた生理・生態的特性や系統・進化的背景の解明が課題である。

## P-104

# Cultivable proteolytic bacteria and their proteases in three Antarctic freshwater lakes

○Mihoko Matsui<sup>1</sup>, Akinori Kawamata<sup>2</sup>, Makiko Kosugi<sup>3</sup>, Satoshi Imura<sup>4</sup>, Norio Kurosawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Soka Univ., <sup>2</sup>Ehime Pref. Sci. Mus., <sup>3</sup>Chuo Univ., <sup>4</sup>Nat. Inst. Polar Res.

E-mail: e15m5720@soka-u.jp

Antarctica is one of the extreme environments for creatures. However, in the Antarctic coastal freshwater lakes, the water temperature increases to 5-10°C in summer, and the biological activity is accelerated. In this environment, cold active protease-producing bacteria as decomposer may play a large role to hydrolyze protein produced by a kinds of protists. In this paper, we report the results of cultivation of proteolytic bacteria derived from three Antarctic coastal freshwater lakes. The water samples including surface sediments were collected from Lake Yukidori-Ike, Hotoke-Ike and Skallen-Oike during December 2012 through January 2013 in the 54th Japanese Antarctic Research Expedition. The 0.1 mL of the water samples were spread onto LB- or MBSY-skim milk agar plates and incubated at 4 °C . The colonies appeared with clear zones, indicating protease activity, were purified by single colony isolation. The purified strains were identified by the partial 16S rDNA sequences. The crude enzymes were recovered from pure cultures of 18 representative strains, and their specific activities and sensitivity to the several protease inhibitors were examined. Total 63 strains were isolated as cold-active protease producing bacteria, and grouped into seven genera, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Cryobacterium*, *Hymenobacter* and *Polaromonas*. Some of the isolates assumed to be novel species. No species was isolated from more than two lake among the three lakes. A half of the representative strains were psychrophilic and did not grow above 25 °C . From the results of inhibitor tests, nearly all of the isolates secreted metalloproteases. These results expanded our knowledge about bacterial protein degradation in Antarctic freshwater lakes.

## P-105

## 河床礫バイオフィルムにおいて共存する緑藻の生育を抑制する好気従属栄養性細菌

○高城 遥, 西原 亜理沙, 松浦 克美, 春田 伸

首都大・院生命

河床礫上には、緑藻を主要一次生産者とするバイオフィルムが発達している。そこでは多様な細菌が共存し、ミクロな生態系を形成している。しかしながら、それら細菌の緑藻に対する作用についてはほとんど調べられていない。本研究では、河床礫バイオフィルムにおいて緑藻と共存する好気従属栄養性細菌について、緑藻への生育抑制能に注目し、緑藻の生育を抑制する細菌の探索とその多様性を明らかにすることを目的とした。

多摩川中流域の河川礫バイオフィルムを採取し（2016年6月）、分散・希釈した後、緑藻 *Chlorella vulgaris* NIES2170 の細胞を混釈した固体培地に塗布した。培地には緑藻細胞の他に有機炭素源も添加し、好気・光照射条件、24℃で培養した。培養3日後、約500個の細菌コロニーの形成が確認された。そのうち約30コロニーの周りで、緑藻の混釈固体培地に阻止円の形成が確認された。同条件で培養を繰り返し、安定して緑藻の生育抑制能が観察される4株を得ることができた。それら4株の16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、いずれも *Pseudomonas* 属であったが、種レベルで異なると考えられた。これら4株について *C. vulgaris* と液体共培養を行い、経時的に培養液のクロロフィルa量を定量した。単離株との共培養実験では、すべての共培養系で緑藻の生育抑制が見られた。また培養36時間後には緑藻の単独培養系と比較すると、すべての単離株との共培養系でクロロフィルa量が半分以下になった。4株の細菌をそれぞれ単独培養した後、その培養上清を回収し、緑藻の培養液に同量を添加した。緑藻の生育への効果を見たところ、3株の培養上清に生育抑制作用が観察された。

緑藻が優占する多摩川河川礫バイオフィルムから、緑藻の生育を抑制する *Pseudomonas* 属細菌を分離した。これらは種レベルで異なると考えられ、また培養上清にも緑藻の生育抑制作用に違いがあることが示唆された。シアノバクテリアに生育抑制作用を示す *Pseudomonas* 属細菌の報告はあるが、今回単離した細菌はそれらと系統的に異なると考えられた。またこれまでに多摩川の河床礫バイオフィルムから、緑藻の生育を抑制する細菌として *Herbaspirillum* 属細菌も分離されており、河床礫バイオフィルムにおいて多様な系統の細菌が緑藻の生育に影響を与えていることが示唆された。



## P-106

# 深海底熱水活動域に普遍的に生息する化学合成独立栄養細菌の 生物地理学的特徴の解明

○美野 さやか<sup>1</sup>, 中川 聡<sup>2</sup>, 牧田 寛子<sup>3</sup>, 工藤 桃李<sup>1</sup>, 宮崎 淳一<sup>3</sup>, 稲垣 史生<sup>3</sup>, 加藤 真悟<sup>4</sup>,  
布浦 拓郎<sup>3</sup>, 井町 寛之<sup>3</sup>, 和辻 智郎<sup>3</sup>, 高井 研<sup>3</sup>, 澤辺 智雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大・院水, <sup>2</sup>京都大・院農, <sup>3</sup>JAMSTEC, <sup>4</sup>RIKEN

E-mail: sayaka.mino@fish.hokudai.ac.jp

深海底熱水活動域には、化学合成独立栄養微生物に立脚した独自の生態系が育まれている。現場に生息する大型生物は、海域ごとに異なる群集構造を形成することから、地理的分布様式の記載的研究はもとより、分布様式を決定する要因の一つである幼生分散を、海洋物理学的知見と併せて理解する高度な研究も進展している。一方、微生物においては、異なる海域から極めて類似した 16S rRNA 遺伝子情報を持つ微生物が検出されることから、彼らの分散には制限がないことが推測されている。しかしながら、特定の微生物系統群内における詳細な遺伝的・生理学的特徴や分布様式に関しては理解が乏しい。

*Epsilonproteobacteria* 綱 *Sulfurimonas* に属する微生物グループは、常温性の化学合成独立栄養細菌を含み、世界各地の深海底熱水活動域に優占するコスモポリタン種として知られている。我々は、4つの海域（沖縄トラフ、北部・南部マリアナ、中央インド洋海嶺、大西洋中央海嶺）の深海底熱水活動域から分離した 109 株の *Sulfurimonas* を対象に、multilocus sequence analysis (MLSA) 法を確立し、集団遺伝学的解析を行った。その結果、極めて分類学的相同性の高い *Sulfurimonas* であるにもかかわらず、海域独自の遺伝的特徴を有する集団が存在し、大型生物同様に分散は制限されることをつきとめた。本研究では、上述した結果とともに、海域独自の遺伝的特徴の形成に影響しうる要因や、他系統群との比較による分散能の評価、および分離株の各海域環境への適応の可能性について、培養実験に基づく生理学的特徴の結果を加えて報告したい。



## P-107

# 深海底熱水活動域から分離した新規イプシロンプロテオバクテリアの生理生態学的性状

○永田 亮佑<sup>1</sup>, 高木 善弘<sup>2</sup>, 多米 晃裕<sup>2,3</sup>, 布浦 拓郎<sup>2</sup>, 力石 嘉人<sup>2</sup>, 武藤 久<sup>1</sup>, 美野 さやか<sup>4</sup>, 澤山 茂樹<sup>1</sup>, 高井 研<sup>2</sup>, 中川 聡<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>JAMSTEC, <sup>3</sup>(株) マリン・ワーク・ジャパン, <sup>4</sup>北海道大・院水産

深海底熱水活動域は、生物の少ない暗黒の極限環境である深海において、例外的に豊富に生物が見られる場所の一つである。現場生態系の 1 次生産者となっているのが化学合成独立栄養細菌である。彼らは熱水中に含まれる化学物質からエネルギーを取り出して、二酸化炭素を有機物へと変換する。特に、深海底熱水活動域において優占する化学合成独立栄養細菌としてイプシロンプロテオバクテリアが知られており、その生理・生態を解明することは深海底熱水活動域の生態系を理解する上で重要である。そこで本研究では、深海底熱水活動域から新規イプシロンバクテリアを分離し、その生理生態学的性状を明らかにすることを目的とした。2015 年 7 月 29 日から 8 月 6 日の国立研究開発法人海洋研究開発機構の調査航海で、中部沖繩トラフの野甫サイトにおいて採取したチムニーサンプルから、限界希釈法を用いて 55°C で増殖する嫌気性の桿菌を分離した。培地には電子供与体として水素を、電子受容体として元素状硫黄を用い、気相を水素:二酸化炭素 = 4:1 の混合気体とした。分離された嫌気性桿菌は、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析によってイプシロンプロテオバクテリアの Nautiliales 目に属し、その 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から少なくとも種レベルの新規性を有することが示唆された。全ゲノムに加え、本分離株の増殖におよぼす温度・塩分濃度・pH の影響や、利用可能な炭素源、窒素源、電子供与体・受容体などの生理学的知見、脂肪酸解析などの化学分類学的特徴について報告する。

## P-108

## 好熱性シアノバクテリアにおける非増殖高温領域での生残

○川村 のぞみ, 松浦 克美, 春田 伸

首都大学東京・院・生命

E-mail: kawamura-nozomi@ed.tmu.ac.jp

環境中での細菌の分布はその細菌の増殖条件に注目して研究されることが多いが、環境が変動する野外の細菌にとっては、非増殖領域での生残にも重要な意味があると考えられる。しかし、非増殖環境における細菌の分布や生残性については知見が少ない。本研究では、長野県中房温泉の幅広い温度域に発達する微生物群集を対象に、シアノバクテリアの増殖が確認できない高温領域からシアノバクテリアが検出できるかどうかを検討し、さらに分離株の高温耐性を評価した。長野県中房温泉の45℃から86℃の弱アルカリ硫化水素泉中のマット状またはストリーマー状の微生物群集を材料として用いた。45℃から62℃ではシアノバクテリアの青緑色が明確に観察されたが、63℃から86℃では観察されなかった。各温度領域から採取した微生物群集を、密栓したバイアル中で16時間、採取した場所で保温した。実験室で55℃でのシアノバクテリアの増殖の有無、蛍光顕微鏡および蛍光光度計でシアノバクテリアの存在を調べた。さらに、55℃の微生物群集から単離したNK55a株を用いて80℃での熱処理（1-24時間）後の増殖を調べた。採取した微生物群集を熱処理した後55℃で培養したところ、最高で79℃から採取し保温したサンプルからも単細胞性シアノバクテリアの増殖が見られた。増殖が見られる率は、70℃以下のサンプルでは100%であったが、70-75℃では80%、75-80℃では58%、それ以上では0%であった。いずれの試料も65℃での培養ではシアノバクテリアの増殖は見られなかった。蛍光顕微鏡での観察では、79℃までクロロフィルaの蛍光を持つシアノバクテリアと考えられる細胞が観察された。蛍光光度計での測定では、同湿重量のサンプルあたり56℃を100として比較すると、66℃では0.12、76℃では0.006の蛍光強度であった。単離株NK55aに80℃で1時間処理した後の55℃培養では増殖が観察された。24時間80℃処理後も、55℃での増殖が確認できた場合もあった。上記の結果から、野外の温泉水中で増殖が認められない高温領域にも、少数のシアノバクテリアが存在し、55℃で増殖可能なことがわかった。増殖上限が62℃のこの場所のシアノバクテリアが、それより18℃高い80℃まで生残可能であったことは、野外での温度変化に対して意味のある生存戦略であることが考えられた。

**P-109****Ecological insights into hot spring microbial mats: undermat community analysis using NGS sequencing.**○ Vera Thiel<sup>1,2</sup>, Marcus Tank<sup>1,2</sup>, David M. Ward<sup>3</sup>, Donald A. Bryant<sup>2,4</sup><sup>1</sup>Dept. of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University,<sup>2</sup>Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, USA,<sup>3</sup>Dep. of Land Resources and Environmental Sciences, Montana State University, USA,<sup>4</sup>Dept. of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, USA

E-mail: vthiel@tmu.ac.jp

Phototrophic microbial mats develop in the effluent channel of Mushroom (MS) and Octopus (OS) Springs in Yellowstone National Park (USA) over a temperature range of 45-70 °C. The upper green layer, dominated by *Cyanobacteria* and anoxygenic *Chloroflexi*, has been well studied. In contrast, the diversity and metabolic functions of the heterotrophic community in the anoxic/microoxic region of the mat are not well understood. In this study we analyzed the orange-colored undermat of the MS microbial mat using 16S rRNA gene amplicon and metagenomic analyses. 16S rRNA amplicon analysis identified a highly diverse but uneven community, dominated by the anoxygenic chlorophototrophic *Roseiflexus* spp., followed by *Pseudothermotoga* sp. and members of the *Armatimonadetes*, *Aquificae*, and *Chloroflexi*. A high diversity of chlorophototrophic and retinalphototrophic bacteria indicate light is an important energy source even in the undermat. Metagenomic binning analysis disclosed a variety of novel organisms and members of Candidate phyla. The mat ecosystem contains nearly closed nutrient cycles. Despite the low sulfate concentration in the spring water, an active sulfur cycle is maintained in the mats and active sulfate reduction has been shown previously. Metagenomic analysis of the undermat now disclose the different key-players in the sulfur cycling. Carbon and nitrogen enter the biological cycles by cyanobacterial CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> fixation. They are made available to the heterotrophic mat community in form of lactate, glyoxylate/glycolate, and amino acids. The high diversity of amino acid transporter genes in the metagenome is in accordance with isolation-based studies in our lab. After 50 years of studies of these hot spring mats, this study for the first time provides detailed information about the undermat community, and is part of a powerful combination of ? omics- and isolation-based studies to develop a comprehensive understanding of these microbial-mat communities.

## P-110

# 好熱単細胞性シアノバクテリアと糸状性光合成細菌との共培養によるバイオフィルム形成

○河合 繁, 松浦 克美, 春田 伸

首都大・院生命

E-mail: kawai-shigeru@ed.tmu.ac.jp

アルカリ温泉に広く分布する好熱単細胞性シアノバクテリア *Thermosynechococcus* sp. は、増殖条件において細胞凝集や固体表面付着性が観察されていない。温泉地では、本菌を優占種とする微生物マットが温泉流水中で岩肌や砂地表面に付着している様子が観察される。本研究では、微生物マットの形成機構を探るため、共存細菌が好熱性シアノバクテリアに与える影響を明らかにすることを目的とした。長野県中房温泉にて、55℃の温泉水が流れるコンクリート壁面に付着して発達する微生物マットを採取した。マットの一部を光独立栄養条件で静置培養したところ、ガラスフラスコ壁面に緑色のバイオフィルム形成が見られた。バイオフィルムを掻きとり、同条件で培養を繰り返し、再現的にフィルムを形成する培養系が得られた。クリスタルバイオレット染色法を用いて付着画分と浮遊画分の細胞量を調べたところ、付着画分に全体の80%以上が存在すると考えられた。ガラス表面のバイオフィルムを顕微鏡で観察したところ、単細胞性シアノバクテリアの他に、糸状性細菌および桿菌の存在が確認された。好気従属栄養条件で共存細菌を単離し、中房温泉由来の *Thermosynechococcus* sp. NK55a と共培養して、そのフィルム形成能を検証した。試行した33株のうち、1株 (F 1 株) で顕著なフィルム形成が観察された。F 1 株について、16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、糸状性光合成細菌である *Chloroflexus aurantiacus* と100%の相同性を示した。*C. aurantiacus* の近縁種を用いて、同様に試験したところ、*Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 ではフィルム形成が見られなかったが、*Chloroflexus aggregans* strain NBF との共培養によるフィルム形成は見られなかった。単独では細胞凝集性および付着性を示さない *Thermosynechococcus* sp. も他菌の共存条件で、ガラス表面に付着して生育することが明らかになった。フィルム形成に寄与した糸状性光合成細菌は、本培養条件において独立栄養生育を示さないことから、シアノバクテリアから有機炭素化合物の供給を受けていると予想される。

## P-111

### 水素生成型一酸化炭素資化性好熱菌の分離およびゲノム解析

○大黒 達希, 福山 宥斗, 大前 公保, 吉田 天士, 左子 芳彦

京大・院農

E-mail: ooguro@kais.kyoto-u.ac.jp

沖縄トラフ伊平屋北熱水活動域（水深約 1,000 m）には、好気性メタン酸化細菌を共生させている甲殻類ゴエモンコシオリエビや二枚貝シンカイヒバリガイ類が生息している。これら深海生物の群集はメタン湧出地点を示す目印となる。そこでこれらの群集近傍 4 カ所に約 2 ヶ月間、現場微生物捕集器（in situ colonization system; ISCS）を設置した。回収後、ISCS を接種源として、3 つの温度帯で好気性メタン酸化細菌を標的とした連続培養を開始した。現在 3 つの温度帯で、複数の *Methylococcales* 目細菌を含む集積培養系を維持している。培養装置内に形成された微生物マットの群集構造解析からは、群集全体の 10-20% が *Methylococcales* 目細菌であるとの結果を得ている。集積培養系からの好気性メタン酸化細菌の単離は、微生物マットを接種源として随時試みており、現在までに *Methylothermaceae* 科 *Methylomarinovum* 属の新種に相当する株を単離した。*Methylomarinovum* 属については現在のところ、浅海の熱水活動域（水深 23 m）より単離された *M. caldicuralii* 1 種 1 株が報告されているのみであるが、本研究により深海熱水活動域にも生息することが明らかとなった。



## P-112

## 深海性メタン酸化細菌のバイオフィームにおける遺伝子発現

○高木 善弘, 平山 仙子, 阿部 真理子, 津田 美和子, 高井 研

海洋研究開発機構

E-mail: takakiy@jamstec.go.jp

【目的】海洋におけるメタン酸化細菌は、その炭素循環において重要な役割をなすと言われている。しかしながら、分子生物学的手法でのみでその存在、多様性が示唆されているが、分離培養された例は少ない。未培養ながら深海のメタン酸化細菌を代表する株は、イガイ科二枚貝シンカイヒバリガイ類の共生細菌と単系統のクラスターを形成する。本研究は、深海由来のメタン酸化細菌の分離培養を目指し、従来のバッチ培養ではなく、生息域に近い環境を再現できるリアクター培養法による分離培養を試みた。このリアクター培養法は、従来法では培養が非常に困難であったメタン生成アーキアをはじめとする多種多様な嫌気性の難培養性微生物の分離・培養に成功した技術である。【方法】リアクター培養法では、担持体として不織布を使い、連続的にメタン、アンモニアを唯一の栄養源として流入させる装置を使った。この装置を使い、深海から採集したシンカイヒバリガイの鰓組織周辺からの試料を接種し、約3ヶ月間、培養を行った。バイオフィームを構成する微生物に対して、16SリボソームRNA遺伝子のクローン解析、メタゲノミクス解析、メタトランスクリプトーム解析を実施した。【結果】リアクター培養装置の担持体には、バイオフィームが形成され、16SリボソームRNA遺伝子のクローン解析から、このバイオフィームには、メタン酸化細菌が全体の20%~30%を占め、他に *Alphaproteobacteria*、*Plactonomyces* に属する未知系統群の微生物が優先していることが判明した。集積培養されたメタン酸化細菌は、シンカイヒバリガイに共生するメタン酸化細菌と近縁種（16SリボソームRNA遺伝子 97%相同性）であり、他のシンカイヒバリガイ類のメタン酸化共生細菌とクラスターを形成した。【考察】リアクター培養法は、連続系であるので従来の培養法に比べ、より自然環境を再現できる方法であると考えられ、難培養性微生物の分離培養を可能にする方法であることが示された。また、集積に成功したメタン酸化細菌は、16SリボソームRNA遺伝子にもとづく共生細菌と同一クラスターを形成することから、共生細菌との比較実験における自由生活型の対照微生物として、今後の共生細菌の研究を進めるに当り好材料となるはずである。

## P-113

# Detection of nitrogenase activity and *nifH* genes in microbial streamer communities in sulfidic hot springs at Nakabusa, Japan

○ Arisa Nishihara<sup>1</sup>, Mourad Labiad<sup>2</sup>, Shawn McGlynn<sup>3</sup>, Katsumi Matsuura<sup>1</sup>, Shin Haruta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad, Sch, Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, <sup>2</sup>IBFA, Universite de Caen-Normandie, France,

<sup>3</sup>Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology

E-mail: nishihara-arisa@ed.tmu.ac.jp

White-gray filaments are widely observed in streams of sulfidic hot springs at 70 oC to 80 oC. Microbial streamer communities (MSCs) are composed of chemolithoautotrophic bacteria as primary producers. The community structure and sulfur-metabolism are well studied at Nakabusa hot springs. In Nakabusa hot springs, nitrogen-fixing bacteria are supposed to contribute to the development of the MSCs because of nitrogen compounds poor in the hot spring waters. However, little is known about nitrogen-fixing ability and possible nitrogen-fixer in the MSCs. In this study, we characterized the nitrogenase activity and *nifH* gene (encoding nitrogenase) of the MSC at Nakabusa hot springs. MSCs were collected at 72.8-73.8 oC and pH 7.4-9.1 on August 25 in 2016. Nitrogenase activity was determined using acetylene reduction assay. A piece of MSCs was added in vials containing natural hot spring water. The gas phase was replaced with argon gas and supplemented with 15% acetylene. After 17 hours of incubation of the vials at 67 oC hot spring water, the vials were injected with formaldehyde to stop microbial activity. Acetylene reductions were detected from MSCs collected at 72.8 and 73.2 oC (23.8-336 pmol ethylene vial<sup>-1</sup>). Total DNA was extracted from MSCs collected at 73.8 oC and clone library analysis was conducted after PCR amplification of *nifH* gene fragments. The clones all formed a single cluster which showed highest similarity to sequences from environmental clones from non-sulfidic hot springs in Yellowstone National Park and from Aquificaceae; 91.7-94.9 % identity to that of *Thermocrinis albus* DSM 14484, and 90.9-94.0% to *Hydrogenobacter thermophiles* TK-6. This is the first report that MSCs in Nakabusa hot springs showed nitrogenase activity. The *nifH* genes analysis indicated that sulfur/hydrogen-oxidizing bacteria in Aquificales worked as not primary producer but also a nitrogen fixer in the MSCs.

## P-114

### 深海熱水活動域からの多様な好気性メタン酸化細菌の集積培養と単離

○平山 仙子, 阿部 真理子, 高木 善弘, 田中 圭子, 津田 美和子, 西 真郎, 宮崎 淳一, 山本 啓之,  
高井 研

海洋研究開発機構

E-mail: hirayamah@jamstec.go.jp

海洋にはメタン湧出を伴う活動域が多数存在するが、海水中に拡散するメタンを代謝する生物は専ら好気性メタン酸化細菌であると考えられ、それらの活動は環境保全や物質循環において重要な機能を持つと認識されている。海洋の主要な好気性メタン酸化細菌は *Gammaproteobacteria* 綱 *Methylococcales* 目に属するが、培養報告例は非常に少ないため、その生理学的知見は乏しい。一方、海洋試料の遺伝子解析からは、科や属レベルで新奇且つ多様な好気性メタン酸化細菌の存在が示唆されている。本研究室では培養に適した海洋試料を入手した際には好気性メタン酸化細菌の培養を試みているが、これまで深海熱水活動域の試料から培養に成功したことはなかった。しかし今回、沖縄トラフ深海熱水活動域の試料から初めて好気性メタン酸化細菌を集積培養し、また一部を単離したので報告する。

沖縄トラフ伊平屋北熱水活動域（水深約 1,000 m）には、好気性メタン酸化細菌を共生させている甲殻類ゴエモンコシオリエビや二枚貝シンカイヒバリガイ類が生息している。これら深海生物の群集はメタン湧出地点を示す目印となる。そこでこれらの群集近傍 4 カ所に約 2 ヶ月間、現場微生物捕集器（in situ colonization system; ISCS）を設置した。回収後、ISCS を接種源として、3 つの温度帯で好気性メタン酸化細菌を標的とした連続培養を開始した。現在 3 つの温度帯で、複数の *Methylococcales* 目細菌を含む集積培養系を維持している。培養装置内に形成された微生物マットの群集構造解析からは、群集全体の 10-20% が *Methylococcales* 目細菌であるとの結果を得ている。集積培養系からの好気性メタン酸化細菌の単離は、微生物マットを接種源として随時試みており、現在までに *Methylothermaceae* 科 *Methylomarinovum* 属の新種に相当する株を単離した。*Methylomarinovum* 属については現在のところ、浅海の熱水活動域（水深 23 m）より単離された *M. caldicuralii* 1 種 1 株が報告されているのみであるが、本研究により深海熱水活動域にも生息することが明らかとなった。

## P-115

# 地球における生命誕生に必須な含窒素有機物はどのように準備されたか？

○高井 研, 西澤 学, 渋谷 岳造, 斉藤 誠史

海洋研究開発機構

E-mail: kent@jamstec.go.jp

約 40 億年前の生命の誕生と初期進化を支えた最も有力な場の一つとして深海熱水環境が注目されている。その一方、深海熱水環境や他の生命誕生の候補環境において、生命の誕生と存続に必須となる有機物や生体高分子といった材料がどのように生成・供給されたかについては依然不明な点が多い。特に生命活動に必須な生体高分子の材料となるアミノ酸や核酸塩基等の含窒素有機物の起源については、それらの含窒素有機物が宇宙からもたらされたとする「宇宙有機物起源」説と原始地球環境において還元的無機窒素化合物から非生物学的にアミノ酸や核酸塩基が生成されたとする「地球有機物起源」説が提唱されている。しかしどちらの仮説も未だ有力な証拠の提示に至っていない状況である。

仮に「宇宙有機物起源」説を支持する観点から考えた場合、宇宙空間で生成された含窒素有機物(主に難水溶性複雑高分子)が隕石(もしくは宇宙塵)によって地球にもたらされる量論やフラックスについては理論計算による理解が進みつつあるのに対し、隕石衝突時の難水溶含窒素有機物の変性や無機化、原始海洋での動態については全く不明のままである。その決定的な理由は、これまでの隕石衝突再現実験はすべて固体間衝突やその衝撃波による現象を対象としていたことによる。著者らは、宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所(JAXA・ISAS)の垂直型超高速衝突実験装置を用いた隕石—海洋衝突を再現する世界初の実験システムを開発し、そのパイロット実験から固体—液体間衝突の挙動や物理プロセスが固体間衝突の場合と著しく異なることを明らかにした。この予期せぬ結果は、隕石中の難水溶含窒素有機物の変性や無機化、原始海洋の動態を理解するためには、隕石—海洋衝突実験を通じた本質的なメカニズムを明らかにする必要があることを示すものであった。

本発表では、JAXA・ISASの垂直型超高速衝突実験装置と新しく開発された隕石—海水衝突反応装置を用いた世界初の固体—液体間衝突実験の結果を紹介すると共に、冥王代における地球窒素循環を紐解きながら、「宇宙有機物起源」説 vs 「地球有機物起源」説の量論可能性や生命の誕生と初期進化の場の特定に向けた試みを概説する。

## P-116

### **Revisiting electrons, protons, and energy conservation at hydrothermal vents during the emergence of life.**

○ Shawn McGlynn<sup>1</sup>, Wooje Chang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ELSI, Tokyo Institute of Technology, <sup>2</sup>Seoul National University

E-mail: mcglynn@elsi.jp

In this poster, I will discuss the uncertainties of energy usage at the origin of life. It has been strenuously argued that the first organisms used the process of chemiosmosis to harvest energy, but I will argue here that the mechanisms that have been proposed were very unlikely to be used by the first cells. Instead, I propose researchers focus on alternatives such as substrate level phosphorylation and possibly thioester formation as early mechanisms of focusing energy. Towards this goal, I will discuss new data from simulated hydrothermal vent experiments where the focus is on electron transfer, and not proton transfer, as an energy source for driving molecules from their equilibrium in ways that may have been useful to the origin of life.



## P-117

### A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile

○布浦 拓郎<sup>1</sup>, 力石 嘉人<sup>1</sup>, 原田 健史<sup>2</sup>, 森 浩二<sup>2</sup>, 加藤 裕美子<sup>2</sup>, 佐藤 喬章<sup>3</sup>, 柳川 勝紀<sup>1</sup>, 宮崎 征行<sup>1</sup>, 首藤 彩<sup>1</sup>, 大河内 直彦<sup>1</sup>, 藤田 信之<sup>2</sup>, 跡見 晴幸<sup>3</sup>, 高木 善弘<sup>1</sup>, 高井 研<sup>1</sup>

<sup>1</sup>海洋研究開発機構, <sup>2</sup>製品評価技術基盤機構, <sup>3</sup>京都大・工

E-mail: takuron@jamstec.go.jp

還元的TCA回路はWood-Ljungdahl経路と並び、最も始原的な炭酸固定経路とされている。従来、この還元的TCA回路にはATP citrate lyaseやその代替経路(citryl CoA synthase/citryl CoA lyase)が不可欠とされてきた。我々は、始原的バクテリア系統に属す好熱性水素酸化硫黄還元細菌*Thermosulfidibacter*に対し、ゲノム解析、酵素活性測定メタボローム解析及びを行い、添加した炭素源により回転方向が変化する可逆的なTCA回路の存在を明らかにした。これまでの解析結果は、独立栄養条件下において、本菌は、ATP citrate lyaseやその代替経路ではなく、citrate synthaseの逆反応により還元的TCA回路を駆動し炭素固定を行なうことを示す。また、混合栄養条件においてacetateを添加した場合、acetyl CoAを起点に分岐するTCA経路が、succinateを添加した場合、succinateを分岐点とする分岐型TCA経路が機能することを確認した。これらの結果は、ATP citrate lyase等のATP依存citrate開裂は還元型TCA回路に不可欠な要素ではないこと、十分な還元力さえ存在すれば、非ATP依存的にcitrate synthaseの逆反応により還元型TCA回路が成立し、炭素固定経路として機能し得ることを示すものである。さらに、可逆的なcitrate synthaseの機能を伴うTCA回路の存在は、初期生命は偏性の独立栄養や従属栄養生物ではなく、利用可能な物質の濃度に依存して柔軟に代謝を変化させる混合栄養生物として誕生した可能性を示唆する。

## P-118

## たんぽぽ計画の進行状況：微生物曝露実験と微生物捕集実験を中心として

○横堀 伸一<sup>1</sup>, 河口 優子<sup>1</sup>, 橋本 博文<sup>2</sup>, 林 宣宏<sup>3</sup>, 東出 真澄<sup>4</sup>, 今井 栄一<sup>5</sup>, 今仁 順也<sup>6</sup>, 河合 秀幸<sup>7</sup>, 癸生川 陽子<sup>8</sup>, 小林 憲正<sup>8</sup>, 三田 肇<sup>9</sup>, 中川 和道<sup>10</sup>, 奥平 恭子<sup>11</sup>, 佐々木 聰<sup>12</sup>, 田端 誠<sup>7</sup>, 富田一横谷 香織<sup>13</sup>, 藪田 ひかる<sup>14</sup>, 矢野 創<sup>2</sup>, 山岸 明彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京薬大・生命, <sup>2</sup>JAXA/ISAS, <sup>3</sup>東京工大・生命理工, <sup>4</sup>JAXA・研究開発, <sup>5</sup>長岡技大・生物, <sup>6</sup>東京農工大・院機シス工, <sup>7</sup>千葉大・院理, <sup>8</sup>横浜国大・院工, <sup>9</sup>福岡工大・工, <sup>10</sup>神戸大・院人間発達環境, <sup>11</sup>会津大, <sup>12</sup>東京工科大・保健衛生, <sup>13</sup>筑波大・院生命環境, <sup>14</sup>大阪大・院理

E-mail: yokobori@ls.toyaku.ac.jp

高々度での微生物の存在限界の検討と、微生物ならびに生命の起源に関わる有機化合物の宇宙空間での移動の可能性の検討のため、我々は、「日本初のアストロバイオロジー宇宙実験」として、「たんぽぽ：有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集」を提案した。これは、国際宇宙ステーション・日本実験棟（ISS-JEM）きぼう曝露部において、微生物、宇宙塵その他の微粒子捕集実験と、微生物・有機物の宇宙曝露実験を行おう、と言うものである。6つのサブテーマから構成されている。

超低密度固体エアロゲルを1年以上の長期間曝露する事で、宇宙塵やスペースデブリを含む微粒子を採集する。同時に微生物の検出を試み、地球低軌道での地球由来微生物の存在密度の上限を推定する。また、地上で培養した微生物を宇宙空間に曝露する事によって、微生物の宇宙環境での生存時間の推定を行う。そこから、地球由来微生物の惑星間移動の可能性を検討する。さらに、宇宙塵に含まれて地球に飛来する有機物が宇宙空間で変成する可能性を検討する。同時に新規に開発したエアロゲルの利用可能性を検証する。

2015年5、11月より、ExHAM 1、2号機に「たんぽぽ曝露パネル並びに捕集パネル」が搭載され、ISS-JEMきぼう曝露部にて実験中である。曝露期間を3種類（約1年、約2年、約3年）に変えて微生物と有機化合物を宇宙曝露した「曝露パネル」、並びに有機物含有宇宙塵、スペースデブリ、地球起源エアロゾルなどの衝突捕集を行うための極低密度固体エアロゲルを宇宙空間に曝露した「捕集パネル」（捕集パネルはそれぞれ約1年間の宇宙捕集実験に供され、取り替えながら3年間、3セットの実験が行われる）は、2016年夏期より3年間、実験期間が終了ごとに毎年地球へ回収される計画である。2016年6月に1年間宇宙曝露した「曝露パネル」と「捕集パネル」をISS船内に回収し、2セット目の「捕集パネル」の宇宙実験が始められた。ISS船内に回収された曝露パネルと曝露パネルのISS船内対照サンプルは地上に帰還、引き渡し後、解析担当者にサンプルは分配され、解析を進める。「捕集パネル」はまずエアロゲル等への微粒子衝突状況を解析した後、微粒子並びに微粒子の形成した衝突トラックを解析担当者に分配する。

本発表では、たんぽぽ計画について、そのISS上での宇宙実験の進行状況と、第1回目の宇宙での捕集サンプル並びに曝露サンプルの解析に関する現状を報告する。

## P-119

## 蛍光顕微鏡を用いた火星生命探査における蛍光色素系の確立

○村野 由佳<sup>1</sup>, 吉村 義隆<sup>2</sup>, 宮川 厚夫<sup>1</sup>, 佐々木 聡<sup>3</sup>, 横堀 伸一<sup>1</sup>, 佐藤 毅彦<sup>4</sup>, 山岸 明彦<sup>1</sup><sup>1</sup>東薬大・生命, <sup>2</sup>玉川大・農, <sup>3</sup>東京工科大院・医療保健, <sup>4</sup>JAXA/ISAS

火星探査の進捗により現在の火星の姿が明らかになって来た。Mars Reconnaissance Orbiter は液体の水の存在を示唆する春と夏に現れる流出地形RSLを発見した(2011. McEwen et al., Science 333: 740)。RSLに流れる液体は赤外線測定から高塩濃度の水であることが示唆された(Ojha et al. 2015. Nat. Geosci. 8: 829)。また、NASAの火星探査車MSL: Curiosityが生命に必要な軽元素や、化学合成細菌の生存を支え得る還元型硫化物を発見した(Ming et al. 2014. Science 343: 1245267)。有機化合物はMSL上のSAM (Sample Analysis on Mars)によっても検出された(Freissient et al. 2015. J. Geophys. Res. Planets 120: 495)。一方、Yamagishi等(2010. Bio. Sci. Space. 24: 67)は、火星表面土壌の蛍光顕微鏡観察によって生命の有無を検出する火星生命探査を提案した。蛍光色素SYTO24は細胞膜を通過して有機物を緑色に染色し、蛍光色素Propidium Iodide (PI)は細胞膜を通過できないが有機物を赤色に染色する。この2種類の色素を組み合わせ、微生物の生死と有機物の有無を判別する。更に、蛍光の消光によって自家蛍光を持つ鉱物と染色した微生物も識別可能である。

本研究の目的は、蛍光顕微鏡による火星生命探査において、火星土壌中から微生物、有機化合物、鉱物を識別できる蛍光色素システムを確立することである。(1) 蛍光色素の宇宙・火星環境への耐性。顕微鏡を載せるローバー内部は±20℃以内に保たれるが、顕微鏡がより高い温度に曝される可能性がある。そこで、SYTO24とPIを1週間、50、60、70、80℃で保温し、吸光度を測定した。蛍光色素の各温度における吸光度の変化から崩壊定数を推定し、火星表面における色素の安定性を推定した。更に、高温に曝した蛍光色素で微生物の染色が可能であった。従って2つの蛍光色素は蛍光顕微鏡による火星生命探査に使用可能であると結論づけた。(2) 火星探査モデル同等の光学系の作成及び観察実験。現在、火星探査用と同等の光学系をもつ蛍光顕微鏡を用いた色素系の検証を行っている。SYTO24とPIによって染色した微生物は、この顕微鏡で検出可能であった。火星生命探査計画のための蛍光顕微鏡用色素系開発の現状について紹介する。

## P-120

### 立山と富山平野で採取した大気試料中の微生物群集構造

○田中 大祐, 佐藤 圭, 高戸 峻介, 酒徳 昭宏, 中村 省吾

富山大・院理工

E-mail: tanakada@sci.u-toyama.ac.jp

【目的】大気中には、細菌、花粉、菌類、原生生物などのバイオエアロゾルが存在している。また、自由対流圏に位置する高所山岳では、地表からの影響が少ないことから、標高が低い平野部と比較して大気中の微生物群集構造の特徴が異なると考えられるが、十分には解明されていない。そこで、本研究では、富山県の立山と平野部の2地点で同時に採取した大気試料中の微生物群集構造の特徴を次世代シーケンサーとリアルタイムPCRで解析した。【方法】大気試料は、2009～2011年の8～9月に、富山県の立山浄土山山頂付近（標高2,839m）と富山大学理学部棟屋上（標高23m）にて、孔径0.4  $\mu$  mのメンブレンフィルターを用いて採取した。その試料からDNAを抽出後、真正細菌の16S rRNA遺伝子と真核生物の18S rRNA遺伝子を標的とした次世代シーケンサー Miseqによる微生物群集構造解析とリアルタイムPCRによる定量を行った。【結果】細菌群集構造については、富山県の立山と平野部で大きく異なっていると考えられ、Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteriaなどの細菌門が検出された。一方、真核生物群集構造についても、立山と平野部では異なっていると考えられ、担子菌門、子囊菌門、被子植物、コケ植物などが検出された。また、立山ではスエヒロタケ科の担子菌門やキンカクキン科の子囊菌門が多く検出され、平野部ではクロイボタケ綱の子囊菌門が多く検出される傾向が認められた。さらに、リアルタイムPCRによる定量を行ったところ、全真菌および全細菌は立山より平野部で高い値を示し、地表からの影響の差を反映していると考えられた。



## P-121

## 雨水細菌叢の季節性変動解析から明らかにする大気中の微生物長距離移動

○平岡 聡史<sup>1</sup>, 宮原 雅也<sup>1</sup>, 藤井 和史<sup>1</sup>, 町山 (菊地) 麻子<sup>2</sup>, 岩崎 渉<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻, <sup>2</sup>東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻,<sup>3</sup>東京大学大気海洋研究所

E-mail: hiraoka@cb.k.u-tokyo.ac.jp

土壌や海洋に生息する微生物は、土煙や波飛沫によって大気中に巻き上げられ、高度0-11kmの対流圏を風によって流され、雨や重力によって地上に落下することで、海や大陸を越えて数千kmもの長距離を移動し得ると考えられている。大気中の微生物に関する研究は古くから行われており、植物やヒトの病原菌が長距離を伝搬する可能性が示唆されている他、比較的高温で大気中の水蒸気を氷結させる機能を持つINA微生物も大気中から検出されており、雲の生成や降雨の発生に微生物が関与していると考えられている。このような微生物の長距離移動や病原菌の拡散、天候へ与える影響を解明する上で、雨水中の微生物の観測は重要である。実際に既存の培養ベースの研究では、雨水からも病原菌やINA微生物が検出されており、また多くの雨水微生物は海洋や土壌に由来することが示唆されている。一方で、非培養ベースの手法を用いた難培養性微生物を含む網羅的な細菌叢解析は、雨水中の微生物密度の低さや滅菌環境下での定常的なサンプリングの困難さのため、長期間に渡る観測は行われておらず、雨水微生物の由来環境や天候との関係は十分に分かっていなかった。本研究では、低微生物密度サンプルの解析実験手法の確立と1年以上に渡る雨水回収を行い、気象データとの統合的な解析から、雨水細菌叢の多様性や気象条件との関係性、及び微生物の由来環境の推定を行った。

雨水サンプルは2014年5月-2015年10月にかけて千葉県柏市及び東京都文京区の2箇所で回収し、計26サンプルを対象に16S rRNA遺伝子のV5-V6領域の増幅とシーケンスを行った。また、気温、風速、雨量等の気象データと、HYSPLITモデルによる降雨開始直前240時間の大気移動軌跡データを利用し、細菌叢との関係性を解析した。

雨水からはProteobacteriaやFirmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteriaが検出され、複数の病原菌やINA微生物を含む属も検出された。高度2000 mの上空大気の移動経路と細菌叢の関係性を解析したところ、夏季に太平洋側から大気をもたらされた際は冬季に大陸側から大気が移動してくる場合に比べてProteobacteriaの相対存在量が有意に高く、海洋由来の細菌がより多いことが示唆された。また気象条件と細菌叢の相関分析からBacteroidalesの相対存在量が地上気温と有意に逆相関することが示された。経年的なサンプリングから、気象条件に依存して雨水細菌叢が変化していることを示す。



## P-122

### 立川市の大気浮遊細菌の季節変動と生態系に与える影響

○植竹 淳, 當房 豊, 内田 雅己

国立極地研究所

E-mail: juetake@nipr.ac.jp

大気中を浮遊する微生物の存在は昔から認識されており、微生物の地理的分布、人々の健康に大きな影響を与えていることは周知の事実である。しかしながら、これら大気浮遊細菌の日変動、季節変動となると世界的に見ても数例しか研究例がなく、実態がほとんどつかめていないというのが実は現状である。この原因は、シーケンス技術が発達していなかった為、多検体を分析できなかったことにあると思われるが、次世代シーケンサーによる多検体分析が可能となった今日では、サンプルさえ捕集できればその変動を詳細に追いかけることが容易に可能であり、生態系、健康といった要素と詳細に比較していくことができる。

そこで本研究では、立川市にある国立極地研究所の屋上で、2015年12月22日から2016年5月8日にかけて、深夜0時から翌0時までの24時間大気を採取(30l/min)し、計132サンプル(日)のバクテリア16S rDNAの群集構造の変化を明らかにした。

その結果、植物の葉緑体由来の16S rDNAが最も多く検出され、最大で全体の84%を占めた。葉緑体はスギやコナラ由来のものが多く、スギは2月末、コナラは4月中旬にピークがあることから、この多くが季節性のある花粉由来であり、立川の西方に位置する奥多摩の山地から中距離輸送を経て飛来してきたと推測された。これらの影響を除外すると、周辺の土壌由来と思われる*Rhodococcus*属、*Sphingomonas*属、菌根菌である*Mesorhizobium*属の比率が高く、春先に明瞭な季節変化が見られた。このうち*Mesorhizobium*属は3月初旬から比率が急激に増加し最も優占する種類となり、多変量解析の結果、気温、湿度、風向、風速などの気象パラメータよりも花粉の相対比率とよく関連していた。このことから植生の変化と連動して大気中に浮遊していることが示唆され、沈着後の土壌環境に影響を与えうる可能性がある。

## P-123

# 黄砂およびPM2.5の沈着地におけるバイオエアロゾルの微生物群集構造の変化

○牧 輝弥<sup>1</sup>, 笹川 修太郎<sup>1</sup>, 石丸 佳苗<sup>1</sup>, 黒崎 泰典<sup>2</sup>, 大西 一成<sup>3</sup>, 洪 天祥<sup>4</sup>, 陳 彬<sup>5</sup>, 長谷川 浩<sup>1</sup>, 岩坂 泰信<sup>6</sup>

<sup>1</sup>金沢大理工, <sup>2</sup>鳥取大乾地研セ, <sup>3</sup>山梨大院総合研究部, <sup>4</sup>韓国外語大学, <sup>5</sup>中国科学院大気物理, <sup>6</sup>滋賀県立大

E-mail: makiteru@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】中国大陸から日本へと越境輸送されるエアロゾルには、砂漠地帯に由来する鉱物粒子や大陸沿岸部の工業地帯からの汚染粒子に加え、微生物が多く含まれ、その生体・環境影響に市井の関心が集まりつつある。越境輸送される際、大気中浮遊微生物群（バイオエアロゾル）のバイオマスおよび群集構造は変化すると予想されるが、大陸側と日本側で長期間的なバイオエアロゾルの動態変化を調査し比較した研究例は乏しい。本研究では、黄砂現象が見られる春季（2015年3月から6月）において韓国ソウル市と鳥取県米子市において大気粒子を継時的に捕集し、蛍光顕微鏡観察によって大気粒子濃度を調査し、超並列シーケンス解析を使って大気中の細菌群集構造変化を調査した。【実験】2016年3月から6月にかけて鳥取県米子市の建物屋上高度10mにおいて大気粒子を捕集した（鳥取大学協力）、韓国ソウル市でも同様に捕集調査を実施した。大気粒子を孔径0.2umのフィルター上にエアポンプを使って吸引捕集した。粒子を捕集したフィルターに1%ホルムアルデヒドおよびDAPI染色液を加え、粒子に含まれる核酸粒子を染色し、蛍光顕微鏡観察によって大気中の粒子濃度を識別して計測した。捕集した大気粒子に含まれるゲノム(g)DNAをフェノール-クロロホルムを使って抽出し、gDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)で16S rDNA核酸塩基配列を増幅させた。増幅産物を超並列シーケンサーで分析し、細菌群集構造を解析した。【結果と考察】大気粒子濃度の変化にともない、細菌群集構造は変化した。特に、黄色粒子数が増加すると細菌の遺伝子タイプが増え、多様性が増大した。相対存在比が3.00%以上の遺伝子タイプで比較すると、最も多様性になった調査日には11タイプ、多様性が低い調査日には6タイプが確認された。また多様性が増大した調査日には黄砂あるいはPM2.5の飛来が確認でき、日本列島の外部から細菌が飛来したと推測できる。

## P-124

### 陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 (NIES-2109) のドラフトゲノム解析

○加藤 浩<sup>1</sup>, 木村 駿太<sup>2</sup>, 兼崎 友<sup>3</sup>, 藤澤 貴智<sup>4</sup>, 中村 保一<sup>4</sup>, 吉川 博文<sup>5</sup>, 富田-横谷 香織<sup>2</sup>

<sup>1</sup>三重大・生命セ, <sup>2</sup>筑波大・生命環境, <sup>3</sup>東京農大・ゲノムセンター, <sup>4</sup>遺伝研・大量遺伝情報, <sup>5</sup>東京農大・応生科・バイオ

E-mail: katohiro@gene.mie-u.ac.jp

光合成生物であるシアノバクテリア（藍藻）は生命活動を飛躍的に向上させた酸素を地球上で作り出した最初の生物と考えられている。藍藻の棲息範囲は広く、陸棲藍藻 *Nostoc commune*（和名:イシクラゲ）は砂漠といった乾燥、高温、低温でも棲息可能な適応力を有している。イシクラゲから単離された *Nostoc* sp. HK-01 (NIES-2109) は乾燥に耐えられ、また、最近の研究から低真空状態で火星土壌を模擬したレゴリス上で生存し、乾燥高温状態に耐えると報告されている。この宇宙利用に貢献すると考えられる藍藻のゲノムを解析するため、本研究では *Nostoc* sp. HK-01 (NIES-2109) のドラフトゲノム解析を進め、これまで示してきた宇宙環境耐性の結果と合わせて考察する予定である。

## P-125

### 「惑星居住科学」における宇宙環境微生物学研究

○山口 進康

大阪府立公衛研

E-mail: nyyamaguchi@iph.pref.osaka.jp

宇宙航空研究開発機構 (JAXA)・宇宙科学研究所の宇宙環境利用専門委員会においては、宇宙環境利用における今後の重要な研究テーマとして「惑星居住科学」を挙げている。この「惑星居住科学」には、低圧下での燃焼や惑星・衛星での水の確保などの物理学・化学テーマと、宇宙放射線の生物影響や宇宙農業などの生物学・工学テーマが含まれる。なかでも、宇宙農業は今後の長期有人宇宙活動における食料の確保のために重視されており、宇宙居住システム内で植物を栽培するための装置が考案されてきている。このような背景のもと、環境微生物学分野のテーマとして、宇宙植物栽培制御システムにおける微生物の動態解析、すなわちシステム内での微生物の増減とヒトや居住環境への影響の解析や、宇宙植物栽培における有用微生物の利用、さらに栽培液中の有害微生物および有用微生物の real time on-site モニタリングなどに関する研究が始められようとしている。また、微生物の遺伝子発現や遺伝子伝播、バイオフィルム形成などに対する微小重力および宇宙放射線の影響評価についても明らかにしておく必要があると考えられる。そこで本発表では、学会に参加をされている多くの方々と「惑星居住科学」における環境微生物学（宇宙環境微生物学）の意義や今後進めるべき研究テーマに関して議論し、本研究分野の裾野を拓げるためのきっかけにしたいと考えている。

## P-126

## マングローブ林土壤中のメタン生成菌群集が示す特徴的な機能

○新井 宏徳<sup>1,2</sup>, 吉岡 遼<sup>2</sup>, 花澤 俊祐<sup>2</sup>, Vo Quoc Tuan<sup>3</sup>, Tran Kim Tinh<sup>3</sup>, Chandra Shekhar Jha<sup>4</sup>,  
Vinay Kumar Dadhwal<sup>4</sup>, 間野 正美<sup>2</sup>, 白鳥 豊<sup>5</sup>, 犬伏 和之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国際農研・JSPS, <sup>2</sup>千葉大・院園, <sup>3</sup>カントー大, <sup>4</sup>ISRO, <sup>5</sup>新潟農試

E-mail: hiroarai@affrc.go.jp

沿岸生態系は陸上生態系に匹敵する炭素貯留能を有するものの、温室効果ガスであるメタンの強力な放出源にもなり得ると想定されている。しかしそれにも拘わらず、その放出量は十分定量化されていない。そこで本研究では、沿岸生態系からの温室効果ガス放出支配機構を理解するために、マングローブ土壤からのメタン放出量とそれに関与する土壤微生物性を調査した。ベトナムのソクチャンおよびカマウにて、海岸線からの距離が異なる複数の地点、およびインドのスダルバン調査地からマングローブ土壤および空気試料を採取し、複数の異なった条件{好気条件(pH (H<sub>2</sub>O) 6.86~7.72)または嫌気条件(pH (H<sub>2</sub>O) 7.45~8.10)、あるいは異なる濃度の海水の添加処理(未希釈区・2倍希釈区・4倍希釈区・8倍希釈区・超純水区)}で室内培養した後、土壤微生物性を分析した。ソクチャンおよびカマウにおいては、海岸部にて、メタンフラックスおよび好気培養条件下でのメタン生成活性が比較的高かった。メタン生成活性は嫌気培養条件下のほうが好気培養条件下よりも低かった。添加した海水濃度が高いほど、土壤ECは高くなり、pHは低くなったが、メタン生成活性は4倍希釈海水添加区(EC 533 mS m<sup>-1</sup>, pH (H<sub>2</sub>O) 6.67)で、その他の区よりも著しく高くなった。PCR-DGGEの結果、インドとベトナム土壤で群集構造が異なることが示されたものの、同定された菌はいずれもHalobacteria綱に属する高度好塩菌グループに分類された。これらの結果は、酸素の供給に伴い多量に生成された二酸化炭素や、降雨および湛水の流入によって土壤pHが低下したり塩濃度が調整されることで、局時的・局所的にメタン生成菌が高活性となる最適pH・塩濃度環境が生じ、メタンを多量に発生させている可能性や、マングローブ土壤のメタン生成活性は、土壤環境の還元度よりも、むしろpHや塩濃度に強く支配されている可能性を示している。今後の課題として、(1)よりメタン菌のDNA配列に特異的なプライマーを用いてメタン菌群集構造を評価すること、(2)酸素の供給に伴う粗大有機物の脱水縮合の促進にともなうメタン生成菌の基質量の増加の可能性の検討、(3)酸素供給に伴う嫌氣的メタン酸化の阻害の可能性を検討することがあげられる。



## P-127

## 人工水田土壌のメタン生成活性と微生物群集に及ぼす土壌構成要素の影響

○村瀬 潤, 前田 悠

名古屋大・院生命農

E-mail: murase@agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】土壌とは多様な要素からなる複雑系であり、各要素が土壌中の化学反応や微生物代謝に与える直接的な影響を個別に明らかにするのは困難である。本研究では水田の土壌構成要素が微生物の機能・生態に与える影響を解析することを目的として、土壌から構成要素を分離した後に再統合する人工土壌の作成を試みた。嫌気環境での有機物分解を対象として、人工土壌の微生物活性と形成される微生物群集に及ぼす土壌構成要素の影響を解析した。【材料および方法】愛知県農業総合試験場安城農業技術センターの水田土壌から土壌構成要素として土壌鉱物、植物遺体、腐植物質、微生物を分離した。定量値を参考にして分離した各要素を混合し、構成要素の組成が異なる人工土壌を作成した。調製した人工土壌に炭素源として稲わら粉末を0.6% (w/w) 添加し、水飽和条件として密閉容器内で嫌気培養し、気相に放出されるCO<sub>2</sub>およびCH<sub>4</sub>の濃度を経時的に測定した。また、培養終了後の土壌に形成された微生物群集を16S rRNA遺伝子を対象としたPCR-DGGE、アンプリコンシーケンスにより解析した。【結果および考察】全ての要素を混合した人工土壌のCO<sub>2</sub>生成は、当初元の土壌の約20%程度しかなくCH<sub>4</sub>はほとんど生成しなかった。生成量の向上を目指して各要素および人工土壌の調製法を検討した結果、腐植物質、特にフルボ酸が微生物活性を大きく左右することが明らかとなった。また、腐植物質と鉱物を混合してから微生物を接種するまでに一定時間静置することで活性は増大し、最終的に元の土壌に匹敵するCO<sub>2</sub>およびCH<sub>4</sub>生成を示す人工土壌が作出できた。メタン生成系が確立した人工土壌の微生物群集は元の土壌に比べて極めて単純であり、Clostridiaが元の土壌では全体の7-11%を占めるのに対し、人工土壌では62-95%と高い優占度を示した。腐植物質を添加した土壌では*Geobacter*、*Methanocella*の割合が減少した。一方、*Anaeromyxobacter*は腐植物質を添加し一定時間静置した人工土壌でのみ検出された。以上の結果から、腐植物質は鉄還元やメタン生成過程での微生物群集の構造やそのはたらきを左右する重要な土壌構成要素であることが示された。また、同じ機能を果たす微生物群の中に異なる環境条件に適応したグループが混在することで土壌機能の冗長性が維持されることが示唆された。

## P-128

# 水田土壌から分離されたメタン生成古細菌によるバイオシリカ形成

海野 裕晃, 矢野 勝也, ○浅川 晋

名古屋大・院生命農

【目的】 地殻を構成する元素の28%を占めるケイ素(Si)は、ケイ藻や一部の海綿、イネ科の植物などの真核生物の生育には欠かすことのできないものである。一方で、ケイ酸が大量に溶解する熱水中に生育する一部の好熱性細菌やシアノバクテリアなどの原核生物は、周囲に溶解しているケイ酸を細胞の周囲に析出させる能力を有することが報告されている。これらの原核生物は細胞周囲のケイ酸析出物（バイオシリカ）によって捕食や紫外線などのストレスに対する耐性を得ている可能性が考えられている。湛水条件下の水田土壌中ではケイ酸が溶解するため、水田を生育の場とする土壌微生物もケイ酸を析出させる能力（バイオシリカ形成能）を有する可能性が考えられる。本研究では、水田土壌微生物として絶対嫌気性のメタン生成古細菌を研究対象に用い、水田土壌からの分離株についてバイオシリカ形成の有無を確認するとともに、菌の生育に与える影響についても調査した。

【方法】 水田土壌から分離されたメタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* TMA を供試菌株とし、メタケイ酸ナトリウム・5水和物 ( $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) を添加した培地で培養し、経時的に培養液中の細胞と析出物の観察・分析を行った。エネルギー分散型元素分析装置搭載の低真空走査型電子顕微鏡により細胞の性状と細胞周囲の析出物の観察と元素分析を、X線分析顕微鏡により集菌した菌体細胞への析出物の観察と元素分析を行った。

【結果】 ケイ酸無添加の培地では *M. mazei* TMA の培養菌体の細胞周囲にケイ素の析出は認められなかったが、ケイ酸添加培地で生育した菌体の細胞周囲にはケイ素を含む析出物の付着が確認された。加えて、培養液中のケイ酸濃度や培養時間の増加に比例して析出物が増加する傾向が観察され、*M. mazei* TMA の細胞集合体 (aggregate) が大きく生育する傾向も観察された。これらのことから、*M. mazei* TMA 株はバイオシリカ形成能を有しており、水田土壌中においてケイ酸となんらかの相互作用を持ち生育している可能性のあることが示唆された。

## P-129

# 水田土壌より分離した水素生成細菌株の *hydA* 転写活性はパラログ間で異なる

○馬場 竜子<sup>1</sup>, 森田 麻友美<sup>2</sup>, 浅川 晋<sup>1</sup>, 渡邊 健史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院生命農, <sup>2</sup>元名古屋大農

E-mail: baba.ryuko@hotmail.co.jp

水素は嫌氣的な有機物分解の過程で生成される中間代謝産物のひとつである。水素代謝は主としてヒドロゲナーゼが触媒し、特に水素生成反応は [FeFe]-ヒドロゲナーゼが触媒するとされる。これまで、演者らは [FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心を有するサブユニットをコードする遺伝子 *hydA* を対象とした解析により、湛水により嫌氣的となる水田土壌の水素生成微生物群集の多様性・動態の解明を試み、その結果 Firmicutes および Deltaproteobacteria を中心に多様な水素生成微生物が水田土壌中で *hydA* を転写することが示唆された。しかし、水田土壌の水素生成微生物が水素を生成しているときに *hydA* を転写しているかどうかや、ゲノム中に多数のパラログが存在する場合がある *hydA* のそれぞれがどのように転写されているかは不明だった。そこで、本研究では、水田土壌の水素生成微生物が水素生成時に *hydA* を転写するとともに、複数の *hydA* パラログの中で転写される *hydA* の種類やその転写活性が細菌の生理によって変化するという仮説を立て、水田土壌から Firmicutes および Deltaproteobacteria に属する 2 種の水素生成微生物 (*Clostridium* sp. H2 株および *Desulfovibrio* sp. A1 株) を分離し、*hydA* 転写活性の解析を実施した。H2 株および A1 株はそれぞれ少なくとも 5 および 2 種類の *hydA* パラログを有することが確認された。H2 株はグルコースを基質とした単独培養条件で、A1 株は乳酸および硫酸塩を基質とした硫酸還元単独培養条件と、乳酸のみを基質とし、水素利用性メタン生成古細菌である *Methanobacterium* sp. AH1 株と共生的メタン生成条件で培養を行った。その結果、H2 株の *hydA* のうち 2 種類は活発な水素生成に先んじて転写活性が増大することが明らかとなった。また、A1 株については、1 種類の *hydA* の転写活性が共生的メタン生成条件で増大するとともに、その増大の後に水素生成速度もピークに達した。以上より、*hydA* が水素生成時に転写されることに加え、*hydA* の転写制御にはパラログ間で差があり、それらの転写活性が培養時期や生理条件の違いにより変化することが示唆された。

## P-130

# Effect of various ecological conditions and land use on microbiological processes in connection with C-and N-cycles

○ Janos Katai<sup>1</sup>, Agnes Zsuposne Olah<sup>1</sup>, Zsolt Sandor<sup>1</sup>, Magdolna Tallai<sup>1</sup>, Imre Vago<sup>1</sup>, Kazuyuki Inubushi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fac. Ag. Food. Envir., Univ. Deb., Hung, <sup>2</sup>Grad. Sch. of Horti., Chiba Univ.

E-mail: katai@agr.unideb.hu

Japan and Hungary have very different climatic and ecological capabilities due to their geological locations. Japan has a maritime climate, while Hungary has continental. In Japan, the most important soil parent materials are volcanic (the Andosols formed on this) and alluvial origin, sediment (paddy field), while in Hungary in the Great Plains the most important bedrock is the loess, on which mainly the fertile chernozem soils are formed among others. The two countries have different soil types, they cultivate various crops, they use other cultivation methods and of course their impacts of these factors on soil properties also have different. Soil samples from experiments in Numata (Japan) region of a grass vegetation, a forests and an apple orchards without fertilizers and fertilizer treatments as well as soil of a rice paddy field were examined. The Hungarian soil samples origin from Debrecen-Latokep and Gorbahaza long-term fertilization experiments from tree treatments (control, medium and high doses of fertilizer doses), the test plant was corn. The aim of our cooperation was to compare the most important physical, chemical and microbiological properties of soils from the Japanese and Hungarian fertilization experiments. The Japanese Andosols have significantly higher moisture and organic matter content than the Hungarian soils, these properties heavily influenced on the mineral nutrients and microbial processes in soils. Japanese soils had higher microbial biomass (MBC), urease activity and nitrate exploration than Hungarians. At the same time Hungarian soils had higher saccharase activity and carbon-dioxide production compared to the Japanese soils. The fertilizer application slightly increased the values of MBC in the Hungarian soils, while the urease activity and nitrate exploration were increased significantly. The microbial activity of Japanese soils decreased according to land use, in the following order: forest, grassland as well as apple orchards.



## P-131

### 放線菌フランキアの窒素固定変異株のスクリーニングと特徴づけ

○松山 伸太郎, 玉利 大樹, 九町 健一

鹿児島大・院理工

フランキアは窒素固定能を持つ多細胞放線菌の一種である。ハンノキやモクマオウなどアクチノリザルと呼ばれる植物の根に共生して根粒を形成することもできる。フランキアはベシクルと呼ばれるホパノイド脂質の多重層で覆われた球状細胞を分化し、そこで窒素固定を行う。窒素固定酵素の合成に関わる *nif* 遺伝子群は、他の窒素固定細菌のものと相同性を示し、それらの転写は他の窒素固定細菌と同様に窒素欠乏時にのみ活性化される。しかしフランキアのゲノムには、既知の *nif* 遺伝子調節遺伝子は存在しない。またベシクル形成はフランキアの特有の性質であり、これに関わる遺伝子は分かっていない。本研究では遺伝学的手法により、フランキアの窒素固定に関わる遺伝子を同定することをめざし、窒素固定に異常を示す変異株をスクリーニングした。私たちの研究室では単一遺伝子型の細胞のみからなる菌糸を濃縮する方法を開発し、フランキアにおいて機能欠損型の変異株を単離できるようになった (Kakoi *et al.*, *Microbes Environ*, 29, 31-37, 2014)。ニトロソグアニジン (NTG) (3556 個) および、ガンマ線 (3248 個) で変異処理したコロニーを窒素源を含まない固体培地で培養したところ、それぞれ 19 および 16 株が生育に異常を示した。よりはっきりした表現型を示した 12 株 (N3H4, N4H4, N6F4, N7C9, N9D9, N10E6, G26C1, G23C4, G17D5, G23D3, G21E10) について詳細な特徴づけをおこなった。G1G7 株を除いた 11 株は窒素を含まない液体培地で生育せず、窒素固定活性 (アセチレン還元活性) も示さなかったため、窒素固定に関わるなんらかの遺伝子が変異していると考えられた。窒素非存在下でベシクルの観察を行った結果、ベシクルを分化しない株がいくつか見つかった。RT-PCR により窒素固定関連遺伝子の発現を調べたところ、いくつかの変異株で *nif* 遺伝子の発現が減少していた。N3H4, N10E6, G21E10, G23C4 株では窒素固定能が回復した復帰変異株を単離することができた。これらのゲノム解析を行うことで原因遺伝子が特定できると期待される。



## P-132

## 水田土壌に優占する微生物の新機能:鉄還元菌こそが窒素循環に重要である Iron reducing bacteria are principal drivers of nitrogen transformation in rice paddy soil

○増田 曜子<sup>1</sup>, 伊藤 英臣<sup>2</sup>, 白鳥 豊<sup>3</sup>, 磯部 一夫<sup>1</sup>, 大塚 重人<sup>1</sup>, 妹尾 啓史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大・院農, <sup>2</sup>産総研, <sup>3</sup>新潟農総研

E-mail: ygigico@gmail.com

湛水下の水田土壌においては、酸素濃度が著しく低い嫌気的な環境が発達する。この環境下では、土壌中の異化的窒素還元反応（窒素生成型硝酸還元（脱窒）、アンモニア生成型硝酸還元（DNRA）、窒素固定）が進行し、このことが畑土壌では見られない『硝酸の低溶脱』『窒素肥沃度の維持』といった水田土壌の環境保全性の基柱であると考えられている。しかし、これらの反応を駆動する微生物群の包括的な理解は未だ達成されていない。従来、水田土壌中の異化的窒素還元反応微生物群を明らかにするためにPCRベースの手法が多く用いられてきたものの、近年の研究によりPCRベースの手法は解析対象の微生物群の多様性を著しく低く見積もってしまう可能性が指摘されている。そこで本研究では、そのようなリスクを回避することができるメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析により、水田土壌中の異化的窒素還元反応に関わる微生物群集構造の解明を試みた。土壌DNAおよびRNAに基づくオミクス解析により、従来のPCRベースの手法でよく検出されてきた脱窒菌や窒素固定菌のものよりも、PCRベースの手法では検出されてこなかった*Deltaproteobacteria*綱細菌由来の異化的窒素還元反応の酵素遺伝子が極めて高頻度に検出され、*Deltaproteobacteria*綱細菌が還元的窒素循環反応に最も寄与していることが示唆された。その中でも、これまで世界的に水田土壌に優占することが知られ、鉄還元反応を駆動する細菌として有名な*Geobacter*や*Anaeromyxobacter*由来の一酸化窒素還元酵素、一酸化二窒素還元酵素の各遺伝子（*nor*, *nos*）、DNRAの鍵酵素遺伝子（*nrf*）、窒素固定遺伝子（*nif*）の転写産物が高頻度に検出された。これらのことから、これまで窒素還元への関与がほとんど議論されてこなかった*Geobacter*や*Anaeromyxobacter*が、脱窒反応の一部を担って硝酸を速やかに無機化し、DNRAや窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、それらが水田土壌の硝酸溶脱の低減や窒素肥沃度の維持に大きく寄与していることが示唆された。本研究は、水田土壌の窒素循環を駆動する微生物群集構造に関する知見を大いに刷新し、生態系における*Geobacter*や*Anaeromyxobacter*の新たな機能を提唱するものである。

## P-133

### 水田の真核生物相とメタン発生量の経時変化

○酒井 順子<sup>1</sup>, 常田 岳志<sup>1</sup>, 林 健太郎<sup>1</sup>, 片柳 薫子<sup>1,2</sup>, 白井 靖浩<sup>1,3</sup>, 中村 浩史<sup>4</sup>, 酒井 英光<sup>1</sup>, 長谷川 利拡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>農研機構・農業環境センター, <sup>2</sup>森総研, <sup>3</sup>農研機構・北農研, <sup>4</sup>太陽計器(株)

E-mail: kyoriko@affrc.go.jp

【背景】水田は温室効果ガスのメタンの主要な発生源の一つであり、メタンは土壌古細菌によって生成されている。その一方で、水田にはメタン生成菌以外にも様々な生物が生息し、相互に影響していると考えられる。これまでの解析から水稲栽培期間中の土壌では、細菌、古細菌に比べて真核生物の経時変化の大きいことが明らかになっている。本研究では、メタンフラックスの変化と真核生物群の増減の関係を解析した。

【方法】茨城県つくばみらい市水田圃場のメタンフラックスをチャンバー法で経時的に測定した(2012年)。同年の同水田において、表層より2.5～5 cmの土壌をコアサンプラーで採取し2 mmのふるいを通した。メタン発生前、発生初期、最発生期、減少期、落水期の5時期の土壌を乳鉢で粉碎してDNAを抽出し、18S rDNA配列の次世代シーケンス解析(454 GS Jr, Roche)を行った。また定量PCR法で細菌および古細菌rDNA数を測定した。

【結果】メタンは5月末の田植え後、6月中旬から発生し、8月初旬に最大値を示した後8月中旬にはやや減少した。真核生物のrDNA存在比を解析した結果、メタンフラックスと正の相関を示した生物群はイネおよび線虫であった。また、たん水期に増加した線虫の大半は、捕食性グループに属した。一方、原生生物の存在比はたん水後に増加した後、8月初旬のメタンフラックスのピーク時に大きく減少した。多くの原生生物は落水まで減少した状態を維持したが、繊毛虫のグループは8月中旬には増加し、メタンフラックスおよび線虫と負の相関を示した。真核生物の中ではイトミミズ科のrDNAが最も高い割合で検出された。イトミミズ科rDNAは、たん水期間中、真核生物rDNAの20%前後を占め、8月中旬に30%程度まで増加した。

すなわちたん水後、最初に原生生物が増加し、次にこれを捕食する線虫が増加(あるいは成長)し、さらにイトミミズが増加(あるいは成長)していた。原生生物が減少する時期にメタン生成菌を含む古細菌数が増加しており、真核生物の増減とメタン発生の関連が示唆された。

## P-134

**メタン酸化が駆動する水田の微生物食物連鎖の構造は根圏と非根圏で異なる**

○日比野 優子<sup>1</sup>, 常田 岳志<sup>2</sup>, 大久保 卓<sup>2</sup>, 荒井 見和<sup>2</sup>, 林 健太郎<sup>2</sup>, 酒井 英光<sup>2</sup>, 長谷川 利拡<sup>2</sup>, 村瀬 潤<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院生命農, <sup>2</sup>農研機構・農業環境セ

E-mail: hibino.yuuko@g.mbox.nagoya-u.ac.jp

水稲根圏ではメタンの生成と同時に酸化も活発に起きており、水田からのメタン放出の制御に関わっている。水田土壌ではメタンの炭素がメタン酸化細菌以外の細菌や捕食者を中心とする真核微生物に利用される微生物食物連鎖の存在が示されているが、水稲根圏におけるメタン酸化微生物食物連鎖についてはこれまで知見がない。本研究では、水稲根圏および非根圏土壌におけるメタン酸化が駆動する微生物食物連鎖の存在および構造をDNA-SIP法により比較解析した。メタン酸化が活発になる幼穂形成期につくばみらい市水田圃場にてコシヒカリ根圏試料(水稲根および根に付着した土壌)および非根圏土壌を採取し、ヘッドスペースをメタン濃度2%(v/v)として25℃暗条件でびん培養を行った。その結果、根圏試料、非根圏土壌ともに培養開始直後から速やかなメタン消費が観察された。培養2週間後に試料よりDNAを抽出しPCR-DGGE解析を行ったところ、非根圏土壌にのみ観察された真核微生物のバンドがいくつか確認されたものの、真正細菌群集および真核微生物群集に根圏試料と非根圏土壌で大きな差が見られなかった。密度勾配遠心分離後の「重い」DNA画分の解析から、根圏試料、非根圏土壌ともに真正細菌に加えて真核微生物にメタン由来の炭素が同化されていることが明らかとなった。一方、T4型ファージ群集へのメタン由来炭素の同化は認められなかった。メタン由来の炭素を取り込んだ真正細菌および真核微生物は、それぞれ群集の一部であり、根圏試料では非根圏土壌に比べてより限られていた。真核微生物群集についてはさらにクローン解析を行い、その系統関係を解析した。メタン由来の炭素を取り込んだ真核微生物として、非根圏土壌ではAmoebozoa、Cercozoa、Nematodaが優占した。根圏試料ではAmoebozoaに属する1つのOTUがクローンライブラリの90%以上を占め、Nematodaは確認されなかった。また、AmoebozoaとCercozoaに属する配列は根圏試料と非根圏土壌とで異なるOTUに分類された。以上の結果から、メタン酸化が駆動する微生物食物連鎖の構造は根圏と非根圏で異なっており、根圏ではより限られた微生物が関わっていることが示唆された。

## P-135

ダイズ圃場からの収穫期前後における N<sub>2</sub>O 発生源の特定と  
土着ダイズ根粒菌混合菌株利用による N<sub>2</sub>O 発生削減

○星野 裕子<sup>1</sup>, 秋山 博子<sup>1</sup>, 板倉 学<sup>2,3</sup>, 下村 有美<sup>1,4</sup>, 王 勇<sup>1</sup>, 山本 昭範<sup>1,5</sup>, 多胡 香奈子<sup>1</sup>, 中島 泰弘<sup>1</sup>, 南澤 究<sup>2</sup>, 早津 雅仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>農研機構 農業環境変動研究センター, <sup>2</sup>東北大・生命, <sup>3</sup>現: 京都産業大・総合生命, <sup>4</sup>現: 協同乳業, <sup>5</sup>現: 東京学芸大・教育

E-mail: yuko422@affrc.go.jp

[背景・目的] 亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) 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、その排出削減が求められている。農耕地は、N<sub>2</sub>Oの重要な発生源である。ダイズは、根の根粒に窒素固定菌を共生しており、この根粒が老化し崩壊する収穫前後に栽培圃場からの N<sub>2</sub>O発生が増大することが知られている。我々は、これまでにダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* の不均衡進化法で作成した亜酸化窒素還元酵素強化株 (*nosZ++*) を接種することで、根粒崩壊期におけるダイズ栽培圃場からの N<sub>2</sub>O発生削減に成功した (Itakura et.al, 2013)。本研究では、強化株ではなく亜酸化窒素還元酵素を保有する土着根粒菌 (*nosZ+*) の混合株を利用し、圃場からの N<sub>2</sub>O発生削減を試みるとともに、圃場サンプルの解析により、圃場における N<sub>2</sub>O発生部位を明らかにすることを目的とした。[方法] 2013 及び 2014 年に日本の農耕地から分離した土着ダイズ根粒菌 (*B. diazoefficiens* USDA110 グループの *nosZ+* 系統) 63 菌株の混合培養液をダイズに接種、育苗後、*nosZ-*ダイズ根粒菌が優占している黒ボク土圃場に移植し、栽培した。圃場での N<sub>2</sub>Oフラックスを連続モニタリングするとともに、栽培期間中経時的に根粒を回収した。PCRにより *nosZ* 遺伝子の有無を検定し、さらに RT-PCRにより *nosZ* 遺伝子の発現を調べた。同時期に、圃場より非根圏土壌、根圏土壌、根、根粒を採取し、各部分について N<sub>2</sub>O発生ポテンシャルと無機窒素量を測定した。[結果と考察] 圃場から採取した根粒の N<sub>2</sub>O発生ポテンシャルと無機窒素量は、根粒崩壊期に増大するのに対し、非根圏土壌、根圏土壌、根ではこれらは低いままで、根粒崩壊期の圃場からの主な N<sub>2</sub>O発生源は根粒由来の窒素であることが示唆された。圃場栽培ダイズの *nosZ+* 接種区における *nosZ+* の根粒の割合は、8月から10月にかけて70%以上で、コントロール区に比べ有意に高かった。さらに、この時期、圃場の接種区根粒で *nosZ* 遺伝子が発現していることを確認した。圃場からの N<sub>2</sub>O発生量は、根粒崩壊期に限ると *nosZ+* 接種区で約30%削減された。土着 *nos+* 根粒菌を利用する N<sub>2</sub>O削減法は有効で、変異株を作成する手法に比べ、世界の多くのダイズ栽培地で実施しやすいと考えられる。



## P-136

### ヒ酸呼吸細菌 *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株のヒ酸還元酵素について

○殿村 美森<sup>1</sup>, 山田 樹奈<sup>2</sup>, 天知 誠吾<sup>1</sup>

<sup>1</sup>千葉大・院園芸, <sup>2</sup>千葉大・園芸

*Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株はヒ素汚染土壌より単離された異化的ヒ酸還元細菌で、*A. dehalogenans* 2CP-1 株と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 99.7% 一致する。*Anaeromyxobacter* 属細菌は鉄、硝酸、塩素化合物、ウランなど多様な物質を電子受容体として利用可能なことからバイオレメディエーションへの応用が期待されているが、ヒ酸還元能の存在は PSR-1 株以外には知られていない。本研究では PSR-1 株のヒ酸還元メカニズムの解明を目的としてドラフトゲノム解析、転写解析、酵素活性測定を行った。ドラフトゲノム配列よりヒ素代謝遺伝子を探索した結果、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arrAB*) は認められなかった。一方 DMSO reductase family に属する tetrathionate reductase subunit A とアノテーションされた 2 種類の遺伝子 (PSR1\_00324, PSR1\_00330) を含む遺伝子群 (PSR1\_00321-330) が確認され、それに隣接した領域 (PSR1\_00313-318) およびそれ以外の 2 つの領域 (PSR1\_00117-00127, 01544-01547) に解毒的ヒ酸還元酵素 (Ars) 遺伝子群が存在した。そこで、PSR1\_00324 および PSR1\_00330 と隣接する *arsC* (PSR1\_00314) の転写解析を行ったところ、いずれもヒ酸存在下で転写量が増加していた。ドラフトゲノム配列中で Ars 遺伝子群に隣接した DMSO reductase family 遺伝子は他に存在しないことから、PSR1\_00324、PSR1\_00330 のいずれか、あるいは両方がヒ酸還元に関与する可能性が示唆された。転写解析と並行して、異化的ヒ酸還元酵素の活性測定も行った。PSR-1 株の破碎液の上清を粗酵素液とし、嫌気セルを用いて電子供与体にメチルビオロゲン、電子受容体にヒ酸を添加して活性を測定した。その結果、ヒ酸を電子受容体として培養した菌体の活性 (15.3 U/mg) はフマル酸存在下で培養した菌体の活性 (0.650 U/mg) と比べて 23.5 倍高いことが確認された。以上の結果より、PSR-1 株はヒ酸曝露によりヒ酸呼吸能が誘導されることが示唆された。



## P-137

# アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* 由来の銅含有型 亜硝酸還元酵素 NirK の異種発現および酵素学的解析

○小林 駿<sup>1</sup>, 押木 守<sup>1</sup>, 志田 洋介<sup>2</sup>, 幡本 将史<sup>3</sup>, 山口 隆司<sup>3</sup>, 小笠原 渉<sup>2</sup>, 荒木 信夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>長岡高専・環境都市工学科, <sup>2</sup>長岡技術科学大学・生物機能工学, <sup>3</sup>長岡技術科学大学・環境システム工学専攻

E-mail: ac28828h@st.nagaoka-ct.ac.jp

硝化反応は地球上における窒素循環において重要なプロセスである。硝化反応におけるアンモニア酸化は長らくアンモニア酸化細菌 (AOB) によって担われていると考えられてきた。しかし、近年の研究によりアンモニア酸化を担う古細菌、アンモニア酸化古細菌 (AOA) が発見された。AOAは海洋プランクトンの約40%を占め、海洋、土壌中におけるアンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) の転写量もAOBを大きく上回るなど、地球上におけるアンモニア酸化に大きく関与していることが示唆されている。AOAはヒドロキシルアミン酸化還元酵素をコードする遺伝子を保有していないことなどAOBと異なるアンモニア酸化経路を持つと考えられている。また、AOAはアンモニア酸化の過程においてNOを選択的に除去するとアンモニア酸化活性を失うこと、銅含有型亜硝酸還元酵素 NirK をコードする遺伝子が存在していることから、NOがAOAのアンモニア酸化において重要な役割を担っていることが示唆されている (J. A. Kozlowski *et al.*, 2016)。そこで本研究では、土壌性アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* の保有する銅含有型亜硝酸還元酵素 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。*N. viennensis* の *nirK* 遺伝子をPCR増幅し、pET28aベクターに挿入しプラスミドを作製した。プラスミドを *E. coli* BL21DE3 へ形質転換し、IPTG (終濃度0.1mM) により発現誘導を行った。菌体を超音波処理により破碎した後、遠心分離により可溶性画分と不溶性画分に分離した。可溶性画分を His-tag タンパク質精製用カラム (HisTrap HP) に供し、NirK をイミダゾールによって溶出させた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果、NirK が精製されたことを確認しており、今後、精製された NirK について酵素学的な解析を行う予定である。

## P-138

### 脱塩素化細菌 *Geobacter sp. AY* 株が保有する脱塩素酵素の機能解析

○小林 直央<sup>1</sup>, 押木 守<sup>1</sup>, 吉田 奈央子<sup>2</sup>, 幡本 将史<sup>3</sup>, 山口 隆司<sup>3</sup>, 荒木 信夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>長岡高専・環境都市工学科, <sup>2</sup>名古屋工業大学, <sup>3</sup>長岡技術科学大学

E-mail: ac28829d@st.nagaoka-ct.ac.jp

目的: 脱塩素化細菌 *Geobacter sp. AY* 株は電子供与体として  $H_2$ , 酢酸, ピルビン酸, 電子受容体として 1,2-ジクロロエタン, 硝酸, フマル酸, 鉄(III)を用いることができる細菌であり, 嫌気性脱塩素反応によって, 1,2-ジクロロエタンをエチレンに分解する. 1,2-ジクロロエタンは塩化ビニルモノマーと他の塩素系溶剤の合成に主に使用されており, 地下水汚染物質として工業排水から水生環境に放出されている. また, 化学物質排出管理促進法の第1種指定化学物質に指定されているため, 1,2-ジクロロエタンの無毒化は重要な課題となっている. *Geobacter sp. AY* 株は 1,2-ジクロロエタンをエチレンに分解する際に中間体である塩化ビニルを生成しないことが明らかとなっており, 注目されている. そのため, *Geobacter sp. AY* 株が保有する脱塩素酵素を精製し, 酵素学的特性を調べることを目指した.

方法: 脱塩素酵素は酸素感受性が高いことが報告されているため, 以下の実験は嫌気チャンバー内 ( $N_2$  95%,  $H_2$  5%) で実施した. 菌体を 100 mM  $PO_4$  (pH 7.0) に懸濁させ, 超音波処理によって細胞を破壊した. 粗抽出液を超遠心分離し可溶性画分と不溶性画分に分離した. 膜タンパク質である脱塩素酵素は不溶性画分に含まれており, 不溶性画分へ CHAPS (終濃度 1%) を加え, 2時間インキュベーションすることで脱塩素酵素の可溶化を行った. 脱塩素酵素の精製は液体クロマトグラフィーを用いて行い, 限外ろ過 (MWCO: 30 kDa) によって濃縮した. 脱塩素酵素の純度はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって確認した. 脱塩素酵素による 1,2-ジクロロエタンの還元活性試験は, 電子受容体として 1,2-ジクロロエタン, 電子供与体として methylviologen を用いた反応バッファーを作成し, 吸光度 (578 nm) 測定により測定した.

結果: SDS-PAGE の結果, AY 株菌体から脱塩素酵素が精製できたことが確認できた. 今後, 脱塩素酵素が精製されているフラクションを回収し, 1,2-ジクロロエタンの還元活性試験を行う予定である.

## P-139

# Soil microbial community structures and activities in relation to nitrogen cycling in two contrasting soils in Malawi - community responses to added carbon

○ Akane Chiba<sup>1</sup>, Yoshitaka Uchida<sup>1</sup>, Satoshi Ishii<sup>2</sup>, Patson Nalivata<sup>3</sup>, Keston Njira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Agri., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>University of Minnesota, USA,

<sup>3</sup>Lilongwe University of Agriculture and Natural Resources, Malawi

E-mail: akane.101@hotmail.com

Fallowing is known as one of the conservative farm management techniques, which results in high crop yields and quality, potentially due to some changes in soil microbial structures and activities. However, few studies have investigated these changes in sub-Saharan Africa, where decreasing soil fertility is a serious issue. In this study, we examined the effects of different farm managements on the soil microbial community structures using soils sampled in Malawi, sub-Saharan Africa. Two sites located next to each other were selected. One was the conservatively managed soil (maize after bean, followed by 1 year fallow) and another was the intensively farmed soil (maize after maize, continuous). Meanwhile, the addition of crop residues, including rice straw, is known as a technique to prevent the decrease of soil fertility. Thus, we performed short-incubation studies to investigate soil microbial responses of these soils to rice straw application. Changes in the bacterial diversities in these soils following the addition of rice straw were investigated with 16S rRNA gene approach on Miseq. As an index of nitrogen activity, N<sub>2</sub> O emission, nitrate-N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) and ammonium-N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) were measured at day 3, 12, 25 and 33. The similar trend of nitrogen activities, such as the rapid decrease in soil NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N after rice straw application, were observed in the two soils. However, changes in bacterial community suggested that the responses of dominant groups, such as *Firmicutes* and *Betaproteobacteria*, to added carbon were different between the soil managements. At day 33, *Firmicutes* markedly decreased in continuous soil while it was still abundant in fallow soil. Future studies should focus more on functional genes to understand the gap between soil microbial activities and community.

## P-140

# 硫黄添加堆肥における pH 低下およびアンモニア揮散抑制に寄与する硫黄酸化細菌の生態

○森 裕美, 多田 千佳, 福田 康弘, 中井 裕

東北大・院農

家畜ふんの堆肥化過程におけるアンモニア揮散は、悪臭や酸性雨をはじめとする環境問題や、完成堆肥の窒素含量の低下の原因となる。堆肥に元素硫黄を添加して堆肥化を行うと、堆肥中の硫酸濃度が上昇し、pHが低下して、その結果、アンモニウムイオン濃度が上昇すると報告されている。本反応には、堆肥中の硫黄酸化細菌が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、本研究では、硫黄添加堆肥を作成し、アンモニア揮散抑制効果を確認するとともに、アンモニア揮散抑制に貢献している硫黄酸化細菌の生態を明らかにすることを目的とした。牛ふんに乾燥重量の0.25%の硫黄を添加して堆肥化した硫黄添加堆肥と、硫黄を添加しない非添加堆肥を作成した。堆肥化1ヶ月までは、毎日6時間の堆肥下部から強制通気と、3-4日ごとに切り返しによる攪拌を行った。堆肥化1ヶ月以降は14日ごとに切り返しによる攪拌を行った。攪拌直前に、深さ30cmからサンプルを採取し、pH、アンモニウムイオン濃度、硫酸イオン濃度、アンモニアガス揮散量を測定した。堆肥化開始時および堆肥化14日目と58日目に採取したサンプルにチオ硫酸ナトリウムを添加し、現場温度条件を再現して一定時間培養し、硫酸産生量を測定することにより、硫黄酸化能力を評価した。また、凍結乾燥した堆肥サンプルからDNAを抽出し、硫黄酸化酵素をコードする *soxB* 遺伝子を標的とした real-time PCR法で、硫黄酸化細菌の現存量を調査した。硫黄添加堆肥において、堆肥化14日目以降で硫酸の蓄積、堆肥化58日目でpHとアンモニアガス揮散量の低下が確認された。これらの反応は、既往の研究より時間を要したが、同様の傾向を示した。硫黄非添加堆肥では、硫黄酸化細菌の現存量は、特に堆肥化開始時から14日目にかけて減少し、それに伴い、堆肥の硫黄酸化能力も低下した。一方、硫黄添加堆肥では、堆肥化14日目までの硫黄酸化細菌の現存量の減少は抑えられ、堆肥の硫黄酸化能力も堆肥化初期と同等の値を維持した。本研究によって、硫黄添加法は、堆肥中の硫黄酸化細菌数の減少を抑制し、堆肥の硫黄酸化能力を高めることで、アンモニア揮散を抑制していることが直接的に示された。今後、両堆肥中の硫黄酸化細菌の群集組成を比較し、アンモニア揮散抑制に貢献する本細菌群の生態を明らかにする予定である。



## P-141

## 三宅島初成土壤に生育するパイオニア植物根域のニトロゲナーゼ活性と根圏細菌の解析

○海老原 諒子<sup>1</sup>, 平野 明則<sup>2</sup>, 郭 永<sup>1</sup>, 西澤 智康<sup>1</sup>, 上條 隆志<sup>3</sup>, 太田 寛行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>茨城大・農, <sup>2</sup>茨城大・院・農, <sup>3</sup>筑波大・院・生命環境

E-mail: 13a2009h@vc.ibaraki.ac.jp

【目的】三宅島雄山の2000年噴火は、大量の火山灰堆積と長期にわたる火山ガス噴出によって、土壤形成や生態系再生の面で世界的にもユニークな研究モデルを提供してきた。これまでの研究によって、山頂付近（OY地点）の火山灰堆積物で新たに形成される微生物生態系では、窒素固定活性の鉄酸化細菌が優占したことを明らかにした。その後、OY地点にパイオニア植物としてハチジョウススキが生育するようになり、植生の再生が始まったが、堆積物の全窒素量は依然として低いレベル（ $\leq 0.1$  g/kg）であった。そこで、本研究では、OY地点のパイオニア植物の根域における窒素固定細菌の存在について調査することを目的とした。【方法】植物体（ハチジョウススキ）と火山灰堆積物の採取は、OY地点と、植生の回復が早かったIG7地点から行った。採取した植物体の地下部は、空中振とう法と水中分画法によって、根域と根圏の画分に分けた。これらの標品についてアセチレン還元法でニトロゲナーゼ活性を測定した。活性測定は、1%(v/v) O<sub>2</sub>を含むAr/C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>の混合ガスを気相とし、暗条件、30℃で行った。また、根圏土壤から無窒素リンゴ酸培地を用いて細菌を分離した。【結果・考察】両地点から採取した植物体の地下部においてニトロゲナーゼ活性が検出された。活性を比較すると、OY地点試料よりもIG7地点試料の方が高かった。非根域の火山灰堆積物の活性は、OY地点の試料においては検出されたが、IG7地点の試料においては検出されなかった。以上より、IG7地点の非根域の火山灰堆積物においては、窒素固定細菌のレベルが大きく減少していることが推察された。根圏細菌分離株の同定結果（属レベル）では、OY地点からは(19株)、Collimonas、Duganella、Paraburkholderia、Variovorax、Pseudomonasが分離され、IG7地点からも(21株)、同様な細菌が分離されたが、Oxalobacteraceae科（CollimonasとDuganella）は分離されなかった。OY地点の植物体根圏でのOxalobacteraceae科の存在は、非培養法による先行研究の結果とも一致した。以上の結果より、三宅島火山灰堆積地帯のパイオニア植物の地下部には窒素固定活性があることが示された。分離菌株の窒素固定活性は、現在、測定中である。



## P-142

## 北方林における積雪パターンの変化に対する微生物群集の応答

○岡 裕章<sup>1</sup>, 磯部 一夫<sup>1</sup>, 渡辺 恒大<sup>2</sup>, 館野 隆之輔<sup>3</sup>, 妹尾 啓史<sup>1</sup>, 柴田 英昭<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大・院農, <sup>2</sup>北海道大・院農, <sup>3</sup>京都大・院農

積雪寒冷地域の森林では、冬期の微生物活動による窒素動態が生育期の植物生産に影響を及ぼすと考えられている。また、気候変動により今後積雪量の減少が予想され、積雪量・積雪期間の減少に対する冬期から生育期における生物地球化学プロセスの応答が注目されている。本研究では、北方落葉広葉樹林において積雪期に大規模な除雪実験を行い、積雪量・積雪期間の減少に対する冬期から生育期における微生物群集の応答について検証した。調査は京都大学北海道研究林標茶区において、2013年10月～2015年10月までの2年にわたり行った。研究林内に12のプロット（除雪区6プロット、非除雪区6プロット）を作成し、2014年12月から3月まで除雪区において除雪を行った。2013年～2014年の積雪期間では除雪区・非除雪区で最大60 cmの積雪が、2014年～2015年の積雪期間では除雪区で最大60 cm、非除雪区で最大120 cmの積雪がみられた。10日から2ヶ月に1度の頻度で各プロットから土壌を採取し、全細菌の16S rRNA 遺伝子、全カビの18S rRNA 遺伝子、アンモニア酸化細菌（AOB）およびアーキア（AOA）が有する amoA の定量を行い、それら微生物群の量的変動を解析した。また、16S rRNA 遺伝子の大規模シーケンスを行い、細菌組成の変動を解析した。除雪区・非除雪区ともに、全細菌量と全カビ量は秋から冬にかけて増加し、春先から減少する傾向を示した。また AOB 量は特に積雪期において増加する一方で、AOA 量は減少した。これは秋の落葉による有機物供給によって、冬期において微生物の増殖とともに活発な無機化（アンモニア生成）が生じ、AOB によって硝化されたためと考えられた。除雪処理後の除雪区と非除雪区を比較すると、全細菌量、全カビ量、AOB 量が積雪期間においては除雪区において非除雪区より有意に高い値を示した。これは除雪によって土壌の凍結融解サイクルが増加することで、無機化の基質が供給され、無機化が促進されたためであると考えられた。一方で生育期においては有意な差が見られなかったことから、除雪の影響は生育期には及ばないと考えられた。このように微生物は季節によって量的な変動を示したが、シーケンス解析の結果では細菌群の組成はほぼ一定であり、除雪による差もあまり見られなかった。

## P-143

# 低アンモニア条件下での土壌還流法におけるアンモニア酸化菌の動態解析

○金本 美穂, 西澤 智康, 太田 寛行

茨城大学

E-mail: miho.kanemoto.mk@vc.ibaraki.ac.jp

アンモニアから亜硝酸への酸化はアンモニア酸化バクテリア (AOB) 及びアンモニア酸化アーキア (AOA) が担っている。アンモニアモノオキシゲナーゼ  $\alpha$ -サブユニット (*amoA*) 遺伝子のメタゲノム解析等により、海洋や土壌においてAOAが優先していることが示されてきた。しかし、AOAの分離例は少なくその生態的役割については十分にわかっていない。先行研究において特有のAOAが優先していることが示された自然農法畑地土壌を用いて、 $200 \mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ 水溶液での連続的に土壌還流を行ったところAOBの優先がみられた。AOAはAOBの生育限界以下のアンモニア濃度でも生育可能な種が存在することが示されており、本研究ではAOAの集積を目的とし、より低アンモニア濃度で土壌還流を行い、AOA及びAOBの動態解析を行った。畑地土壌 25 gを含むカラムに、400 mLの $100 \mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ 水溶液を $30^\circ\text{C}$ で還流させた。還流液は200~800時間毎に交換した。カラムより採取した土壌、還流液、還流装置中に発生したバイオフィームからDNAを抽出し、PCRによりAOA-*amoA*及びAOB-*amoA*の増幅を確認した。また、土壌及び還流液のアンモニア濃度を測定した。還流開始後1000時間の還流土壌においてはAOA、AOB双方の*amoA*のPCR増幅が確認されたが、還流液ではAOA-*amoA*のみのPCR増幅が確認された。このときのアンモニア濃度は還流土壌では $98 \mu\text{M}$ 、還流液では検出限界以下であった。AOAは還流液中に分散するが、AOBはアンモニア濃度の高い土壌中にとどまっていたと考えられる。また、還流開始後1500時間のバイオフィームではAOA-*amoA*のみPCR増幅が確認された。バイオフィーム中のAOAをさらに集積するため、土壌カラムを取り除き、連続的に $\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加して還流を行ったところ、1200時間後にはアンモニア消費及びAOA-*amoA*のPCR増幅が確認されなくなり、バイオフィーム中においてAOAは連続的なアンモニアの供給のみでは生育できないことが示された。今後、微生物群集構造解析を行い、低アンモニア還流土壌系におけるAOA及びAOBの動態をさらに解析する予定である。

## P-144

スイカ畑土壌，谷津田水田土壌から oligotrophic な *Nitrosospira sp.* の分離

○堺 奎介<sup>1</sup>, 石川 裕士<sup>1</sup>, 郷原 奏波<sup>1</sup>, 黒岩 恵<sup>1</sup>, 磯部 一夫<sup>2</sup>, 諏訪 裕一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中大院・理工, <sup>2</sup>東大院農

E-mail: a12.rnbb@g.chuo-u.ac.jp

[背景・目的] 土壌や海洋といった実環境のアンモニア濃度はアンモニア酸化微生物 (AOB) の培養に用いられる濃度より非常に低い。環境中では oligotrophic な AOM が優占し、重要であると推察されている。本研究では新規性の高い AOM を純粋分離する戦略として、従来法よりも基質濃度が低い培地を設計した。茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌，谷津田水田土壌を接種源とし，0.15-75 mM の  $\text{NH}_4^+$  を含む培地を用いて，土壌中の AOM を MPN 計数した。優占する AOM を限界希釈法を用いて純粋分離した。また，純粋分離株の 16S rRNA の全長を解析し，既存株および当研究室でこれまで純粋分離した菌株と比較した。[方法] Suwa ら (1994) の C 基礎培地 (pH 7.6) に， $\text{NH}_4^+$  を 0.15, 1.5, 75 mM 添加し，それぞれ CU, CL, CH 培地とした。これらを用いて，茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌，谷津田水田土壌の AOM を MPN 計数した。さらに，7 度の植え継ぎ，限界希釈法を用いた 2 度の純化を行い，CL 培地から AOB を純粋分離した。Heterotroph の混在試験は Suwa ら (1994) の方法で行った。また，16S rRNA による系統解析を Forward primer と Reverse primer を 4 種ずつ用いて行い，HC-1 株，本研究純粋分離株 5 株の 16S rRNA の全長を決定し系統解析を行った。[結果] 茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌，谷津田水田土壌の AOM の MPN 計数値は CH 培地に比べ，CL 培地で 3.5-5.8 倍，CU 培地で 6.3-8.3 倍と oligotrophic な培地で高かった。つまり，oligotrophic な培地で AOM が優占した。CU 培地では優占株の純粋分離には至らなかった。スイカ畑土壌から 3 株，谷津田水田土壌から 2 株の AOM を，CL 培地を用いて純粋分離した。当研究室で純粋分離した *Nitrosospira sp.* HC-1 株 (1)，本研究の純粋分離株 5 株とも 16S rRNA の全長 (1498 bp) を解読し，いずれの株も *Nitrosospira* 属の cluster 3 に類別された。本研究で純粋分離した 5 株は *Nitrosospira sp.* L115 株と 99% の相同性があった。さらに，HC-1 株との相同性が 99% であった。これら 5 株と，HC-1 株はそれぞれ畑土壌，水田土壌，森林土壌と分離源が大きく異なる。このことから，培地成分が同一のときは接種源の土壌の性質が異なっても，同種の菌が分離される傾向があることが示された。以上より新規な株を分離する際，培地組成を変えることが戦略として重要になる。(1) 石川裕士, JSME. 2015. PG-099

## P-145

# メタゲノム解析から見える富栄養湖の窒素循環に関与する anammox の実態

○福原 康平<sup>1,2</sup>, 村上 由夏<sup>1</sup>, 荒井 渉<sup>2</sup>, 小椋 義俊<sup>3</sup>, 林 哲也<sup>3</sup>, 黒川 顕<sup>4</sup>, 諏訪 裕一<sup>1</sup>, 高見 英人<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中央大・院理工, <sup>2</sup>JAMSTEC・資源, <sup>3</sup>九州大・院医, <sup>4</sup>遺伝研・生命情報

【目的】1990年代中盤以降、嫌気性アンモニア酸化（anammox）などの発見が、窒素循環に関する新たな知見をもたらしてきた。そのため現在では、窒素循環は極めて複雑で、数多くの微生物種が関与すると考えられている。しかし、微生物生態系が持つ網羅的機能ポテンシャルとそれを担う微生物群集と窒素代謝能との位置付けについては、あまり報告例がなく、環境中の窒素循環に関与する反応とそれを担う微生物群の全貌は未だ不明である。そこで我々は、anammox と脱窒反応が両方見出された茨城県・北浦について、anammox活性が高いが脱窒活性が低い地点（KU3）に着目し、anammox活性が低い他の2地点との機能ポテンシャル比較を目的としてメタゲノム解析を行った。本研究では特に北浦の生態系に占める anammox微生物の割合と anammox関連遺伝子の分布について検討したのでその結果を報告する。

【方法】MAPLEシステムを用い1)、上記3地点から得たメタゲノム配列から、個別生物種ごとの abundance を求めた。Anammox のゲノム配列は仮想モジュールを作成し、nr database で BLAST 検索した結果から abundance をマニュアルで算出した。また、5種の anammox微生物の hao様遺伝子配列を取得し、系統樹を作成した後、北浦3地点の hao様遺伝子の分布を調べた。

【結果】Anammox の最終反応に寄与する反応を担う事が知られている hao様遺伝子は、anammox の同反応を担う hzo と一つのクラスターを形成したことから、hzo と同様の機能を持つと思われる。3地点から hzo は検出されなかったが、KU3地点では最終反応の担い手である hao1 が検出された。また、anammox とは基質（一酸化窒素；NO）を競合する関係にある脱窒の活性はKU3が最も低く、個別生物種ごとの脱窒の abundance の合計と同じ傾向を示した。

1) Takami, H., et al. DNA research. 2016. doi:10.1093/dnares/dsw030



## P-146

### 16S rDNAに基づくメタゲノム解析による厚岸湖アマモ群落における 亜酸化窒素低減微生物の探索

○イー サイキヤット<sup>1</sup>, 神宮寺 賢<sup>2</sup>, 富澤 璃乃<sup>1</sup>, 梅澤 和寛<sup>3</sup>, 上田 眞吾<sup>2</sup>, 高橋 令二<sup>2</sup>, 福井 学<sup>3</sup>,  
中川 達功<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日大院・生資科, <sup>2</sup>日大・生資科, <sup>3</sup>北大・低温研

E-mail: brsa16002@g.nihon-u.ac.jp

【目的】 2013年に実施した北海道厚岸湖の底泥による亜酸化窒素発生実験において、アマモ群落の底泥からは亜酸化窒素の発生量が認められなかった。この理由として、アマモ群落の底泥には亜酸化窒素を減少させる微生物の存在が推測された。そこで本実験では、アマモ群落と非アマモ群落の底泥を血清ビン内で培養し、亜酸化窒素の増減と培養後の微生物群集構造の変化を調べた。【方法】 2015年7月に北海道厚岸湖アマモ群落と非アマモ群落の底泥をコアサンプラーで採取し、表層0 cmから4 cmの泥を回収した。採取した泥を均一に混ぜた後、血清ビンに加え、ろ過済の海水を添加し、10日間20℃暗所で培養を行った。実験区として次の3つを設定した。1) 1mM塩化アンモニウム添加、2) 無添加、3) 0.34mL亜酸化窒素添加。培養前の泥と培養後の泥からDNA抽出した。16S rRNA遺伝子を標的としたメタゲノム解析を行った。血清ビンの気相の亜酸化窒素濃度は、ガスクロマトグラフィーを用いて調べた。【結果と考察】 アマモ群落由来の培養系の実験区1)と2)は、亜酸化窒素の発生が見られなかった。一方、非アマモ群落の培地では、実験区1)で亜酸化窒素濃度の顕著な上昇が見られた。亜酸化窒素を添加した培養系(実験区3)では、アマモ群落の泥は非アマモ群落の泥と比べ、亜酸化窒素の顕著な減少が認められた。メタゲノム解析より、アマモ群落の全ての実験区において培養後に*Epsilonproteobacteria*と*Bacteroidia*に属する微生物の全原核生物に占める割合が顕著に上昇した。以上の結果より、*Epsilonproteobacteria*や*Bacteroidia*に属する微生物が亜酸化窒素の減少に関与する可能性が示唆された。



P-147

## 海底直上水中の溶存酸素濃度は表層堆積物における細菌群集構造変化の主要な environmental driver か？

○森 郁晃<sup>1</sup>, 山喜 邦次<sup>1</sup>, 梅澤 有<sup>1</sup>, 近藤 竜二<sup>2</sup>, 松岡 數充<sup>3</sup>, 須崎 寛和<sup>4</sup>, 中田 英昭<sup>5</sup>, 和田 実<sup>1</sup>

<sup>1</sup>長崎大・院水環, <sup>2</sup>福井県立大・院海洋, <sup>3</sup>長崎大・海セ, <sup>4</sup>長崎大・院生産, <sup>5</sup>長崎大・水

E-mail: bb53512003@ms.nagasaki-u.ac.jp

【背景】近年、沿岸域において貧酸素水塊形成の高頻度化や大規模化の傾向が強まり、海洋生態系サービスの劣化が懸念されている。特に内湾の貧酸素化は、人間活動との関わりが深く、長期的な監視や影響予測を含む海域モニタリングの精緻化は重要である。本研究では超閉鎖性内湾として知られる長崎県の大村湾において、底層水の貧酸素化に伴う海底堆積物表層の細菌群集構造変化を明らかにし、水柱 溶存酸素濃度の低下がもたらす底生微生物生態系の構造と機能変化について知見を得ることを目指した。

【方法】2011年から2013年の夏季を中心に計20回、大村湾中央部において観測を行い、未攪乱堆積物コアを得た。0-5mm（極表層）及び5-10mm（亜表層）由来DNAを用いて、真正細菌と硫酸還元菌(SRB)の群集構造をARISA法とT-RFLP法でそれぞれ解析した。ARISA法で確認されたOTUの一部はクローン解析により同定した。2012年7-9月の試料は、真正細菌群集の16SrDNA-Tagシーケンスを454 GS FLX titaniumで行い、配列データをMothur (Schloss et al. 2009) で解析した。

【結果と考察】海底直上水中の溶存酸素濃度(DO)は、水温(T)および堆積物中の全有機炭素量(TOC)とともに堆積物細菌群集構造の変化に影響を及ぼし、特に極表層でDOの寄与が最大となった。極表層の細菌群集は、Wright et al. (2012) のDO区分(Oxic; > 90 μM, Dysoxic; 20-90 μM, Suboxic; 1-20 μM, Anoxic: < 1 μM) に基づいてグループ化され、Suboxic領域で細菌群集の多様度(H´)が極大となった。極表層における優占細菌群の一つは*Gammaproteobacteria*であり、DO区分によるグループ化に最も強く影響し、その存在割合はDOと概ね正の相関を示した。SRBは極表層と亜表層間の群集構造の差異が有意に大きく、DOによるグループ化は見られなかった。しかし、Suboxic下では極表層のSRB群集構造の違いにDOが最も強く影響を及ぼした。

## P-148

### 新規海洋性 DMS・DMSO 資化性菌のドラフトゲノムの決定とその諸性質

○高橋 智<sup>1</sup>, 大久保 希実子<sup>2</sup>, 木村 一平<sup>2</sup>, 羽部 浩<sup>3</sup>, 布施 博之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>芝浦工大・院, <sup>2</sup>芝浦工大, <sup>3</sup>産総研

E-mail: mf15051@shibaura-it.ac.jp

海洋における DMS(硫化ジメチル)分解・生成を含む硫黄循環は、雲の発生を介した気候への関連や、悪臭物質の発生・分解という点からそのメカニズムに興味を持たれている。この分解・生成には微生物が関与することが知られているが、その知見は少ない状態である。本研究においては DMS 分解を行う微生物に焦点を当て、その性状や遺伝子に関する解析を行い、海洋における硫黄循環にどのように関与しているか明らかにすることを目的とする。

表層海水サンプルから DMS、DMSO(ジメチルスルホキシド)を炭素・エネルギー源としてスクリーニングを行った結果、3 株 (SF-AQU, Na-w, SAN-WE) を単離した。16S rRNA 遺伝子の解析からこれらの株は *Methylophaga thiooxidans* と最も近縁であったが、相同性は低く、また、3 株同士もその相同性が低く、それぞれ新種であることが示唆された。

Illumina 社の MiSeq を用いた次世代シーケンサーによって 3 株のドラフトゲノムを決定した。これらを RAST を用いて遺伝子解析を行った。3 株は、ともにリブローズモノリン酸経路 (Rump pathway) に特有な 3-hexulose phosphate synthase を保有しており、3 株は Rump pathway によって DMS を炭素源として利用できることが示唆された。ただ、SAN-WE 株は炭酸固定系の遺伝子を有しており、その使い分けについては、今後の検討が必要である。また 3 株は硫黄酸化酵素である Sox 系の遺伝子を保有しており、DMS を分解した後に生じる硫化水素を Sox 系により酸化している可能性が示唆された。保有していたのは SoxA,B,C,D,X,Y,Z で、7 つがほぼ連続していた。Sox 系遺伝子のそれぞれについて BLAST を用いて相同性検索を行った結果、近縁の属にはこの遺伝子を持つ種はおらず、緑色硫黄細菌 *Chlorobium* 属などとの相同性が高かった。

SF-AQU 株については生育条件は以下の通りであった。生育 pH は 6.0~9.0、生育塩濃度は 13.15~52.6 g/L、生育温度は 15~25℃であった。炭素・エネルギー源としては DMS、DMSO のほか、メタノール、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ジメチルジスルフィド、フルクトースで生育が確認された。最も生育が見られたのは DMSO であった。

## P-149

## 多様なメタン酸化細菌が好む環境

○蒲原 宏実<sup>1</sup>, 新野 貴大<sup>1</sup>, 松浦 哲久<sup>3</sup>, 青井 議輝<sup>2,4</sup>, 金田一 智規<sup>1</sup>, 尾崎 則篤<sup>1</sup>, 大橋 晶良<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院工, <sup>2</sup>広島大・サステナセンター, <sup>3</sup>長岡技科大, <sup>4</sup>Northeastern university

E-mail: m155261@hiroshima-u.ac.jp

【背景および目的】メタン酸化細菌 (MOB) は系統的に TypeI と TypeII に分類される。一般的には、TypeI は低メタン濃度・高酸素濃度を好み、TypeII は高メタン濃度・低酸素濃度を好むと報告されている (Amaral et al., 1995)。しかし、低メタン濃度・高酸素濃度環境下で TypeII の検出が確認されている (Hatamoto et al., 2010)。メタン濃度、酸素濃度以外にもアンモニウム濃度、pH、温度が優占種に寄与するかを、多くの研究者が調べている。しかし、その決定的な要因はまだ分かっていない。そこで、本研究では MOB の優占種に影響を与える因子を調査した。【方法】MOB の優占種に影響を与える因子を調べるために、DHS (Down-Hanging-Sponge) リアクターを用いて MOB の培養を行った。メタン濃度 (0.01-80 %)・酸素濃度 (2-20 %)・アンモニア濃度 (0.1-2000 mg-N・L<sup>-1</sup>)・pH (4-7) を変えて、計 38 系列のリアクターを運転した。植種源は活性汚泥とし、リアクターは全系列 30 °C で運転した。メタン濃度を流入部と流出部で測定し、メタン酸化活性を算出した。優占種を FISH により判定した。FISH プロブは、TypeI の検出に M  $\gamma$  84 と M  $\gamma$  705、TypeII の検出に M  $\alpha$  450 を用いた。【実験結果】全ての条件で MOB の培養に成功した。FISH により培養された MOB の Type を判定したところ、MOB の優占種は pH に大きく依存していた。TypeI は中性条件で優占化が確認された。一方 TypeII は、低 pH および NH<sub>4</sub>/CH<sub>4</sub> 値が高い中性条件下で優占化が確認された。培養した TypeI と TypeII の MOB を用いて、pH およびアンモニア濃度がそれぞれメタン酸化活性に及ぼす影響を調べた。pH により活性の大小は異なるが大きな差はなく、どちらの Type も全ての pH 環境 (pH 4-7) で生存可能であった。供給アンモニア濃度を高くすると、両 Type ともメタン酸化活性がわずかに低下した。培養および pH とアンモニア濃度による影響実験の結果から、TypeII は TypeI よりもアンモニウムイオンに阻害されやすいと考えられた。【結論】本研究では、優占する MOB の Type は pH に大きく依存することが示唆された。TypeI は TypeII に比べてアンモニウムイオンの影響を受けやすいため、中性条件においてアンモニア濃度が高い環境では TypeII の優占化を促すことが示された。また、本実験では、どの系も 30 °C でリアクター運転を行ったため、温度による影響を調べる必要がある。

## P-150

### 深海堆積物における亜硝酸酸化細菌の分布

○峯岸 宏明, 平井 美穂, 今野 祐多, 田角 栄二, 野牧 秀隆, 高井 研, 布浦 拓郎

海洋機構

E-mail: minegishih@jamstec.go.jp

亜硝酸酸化菌 (NOB) は広汎な環境に棲息し、これまでに系統的に全く異なる *Nitrobacter*、*Nitrococcus*、*Nitrospina*、*Nitrospira*、*Nitrotoga* の5つのグループが知られている。そして、NOBのエネルギー代謝に不可欠な亜硝酸を硝酸へ酸化する亜硝酸酸化還元酵素 (NXR) においても多様性が知られ、*Nitrobacter*、*Nitrococcus* および *Nitrolancetus* はサイトプラズム型、*Nitrospira* と *Nitrospina* はペリプラズム型を有す。近年、Pesterらは、*Nitrospira* の *nxB* 遺伝子を対象として、新たな検出系の構築を試みている (Pester *et al.*, 2013)。

我々は、深海堆積物表層における無機窒素循環に関わる主要な微生物機能を明らかにするため、分子生態解析を進めており、SSU rRNA 遺伝子を用いた解析結果は、深海堆積物表層における主要な亜硝酸酸化菌は *Nitrospina* あるいは *Nitrospira* であることを示した (Nunoura *et al.*, 2013)。しかし、機能情報はこれまでに得られておらず、また、Pesterらの検出系を用いて *Nitrospira* の *nxB* 遺伝子を試みたが検出には至っていない。

今回、我々は深海堆積物中における亜硝酸酸化に関する微生物機能について、理解をより深めるため、新たに *Nitrospina* および *Nitrospira* に対して、それぞれ特異的に検出可能な *nxB* および 16S rRNA 遺伝子プライマー構築し、日本海溝および小笠原海溝表層堆積物におけるそれぞれの分布をクローン解析により検証した。その結果、従来の定量PCRによる 16S rRNA 遺伝子の検出と大凡整合する NOB の分布が確認されると共に、属内の *nxB* や 16S rRNA 遺伝子系統解析は、*Nitrospira*、*Nitrospina* 共に、既知の陸上環境から検出された系統群とは異なる深海堆積物に特異的な系統群が存在することを示した。



## P-151

# 微生物凝集体ソーティングによる未培養な亜硝酸酸化細菌 *Nitrotoga* の獲得と生存戦略

○石井 拳人<sup>1</sup>, 藤谷 拓嗣<sup>1</sup>, 中川 達功<sup>2</sup>, 高橋 令二<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早大・院生医, <sup>2</sup>日大・生資科・生命化

E-mail: izanagi-izanami@suou.waseda.jp

【目的】 *Nitrotoga* は亜硝酸酸化反応を担う、唯一の *Betaproteobacteria* 綱に属する化学合成独立栄養細菌である。様々な環境からクローンが検出されているにも関わらず、増殖速度が遅く、他の微生物と密な凝集体を形成しているため、純粋培養が難しい。そこで本研究では、微生物間相互作用によって形成された凝集体に着目し、*Nitrotoga* の高度集積株を獲得するとともに、*Nitrotoga* の生理学的性質を明らかにすることを目的とした。【方法】 新規なサンプルソースであるアマモ群落の砂を採取し、NaCl濃度を調製しながら低温で集積培養した。続いて、集積株をセルソーターへ供試し、微生物凝集体の大きさと複雑さを表す前方散乱光と側方散乱光を指標に、*Nitrotoga* の凝集体を選択的に分取した。さらに、高度集積株を用いて生理活性試験を行った。【結果および考察】 7年間低温培養することで *Nitrotoga* の占有率は80%に達し、他の亜硝酸酸化細菌が混在しないことを確認した。クローニングにより集積株は29菌種の細菌を含んでいることが推定され、*Nitrotoga* の集積株を *Candidatus Nitrotoga amamosa* AM1 と命名した。集積株AM1は、シングルセル、あるいは従属栄養細菌との凝集体として存在した。凝集体をソーティングし、継代培養した結果、AM1の占有率を99%まで高めることに成功し、共生菌として *Acidovorax* sp. を同定した。集積株における従属栄養細菌の種類は多様であったが、凝集体をソーティングしたことで共生菌種を減少させることができた。高度集積株を用いた生理活性試験では、AM1に特有の生理学的性質を明らかにした。AM1の最適温度は他属の亜硝酸酸化細菌と比較して10℃以上低く、低温性の亜硝酸酸化細菌であることが判明した。また、高濃度のアンモニアに対して耐性があり、30 mM以下では亜硝酸酸化速度を加速させた。本研究により、AM1は低温やアンモニアに対して幅広い適応性を示し、多種多様な亜硝酸酸化細菌において独自の生存戦略をとっていることが示唆された。



## P-152

### 海底泥火山メタンプルーム中の微生物群集構造

○砂村 倫成<sup>1</sup>, 原 修一<sup>2</sup>, 角皆 潤<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東大・院理, <sup>2</sup>名大・院環境

E-mail: sunamura@eps.s.u-tokyo.ac.jp

付加帯や沿岸域の海洋堆積物は多くのメタンを胚胎し、その一部は泥火山を含むメタン湧水として海底から海洋に放出される。放出されたメタンは海洋中で希釈もしくは微生物による酸化をうけて濃度が減少する。海洋中へのメタンの供給には、他に海底熱水活動が知られており、安定同位体、微生物培養、群集構造からメタンの微生物による酸化が示されており、北西太平洋では *Methylococcales* がメタン酸化の主役を担っている。近年、メタンハイドレートへの注目とともに、沈み込み帯の陸側斜面から多くの泥火山地形が発見されており、その一部はメタンを放出していることが明らかになっている。本研究の目的は、水深の異なる 3 箇所の泥火山から海洋中に放出されるメタンプルームの微生物群集構造を調べ、メタンの挙動への微生物の関与および微生物種や群集構造の特徴を明らかにすることにある。KK13-2 および KS14-11 航海にて、足摺岬沖(水深約 800m)、種子島沖(水深約 1500m)、および東シナ海(水深約 180m)にて採取した海水試料について、メタン濃度、メタン炭素同位体、微生物細胞数、16S rRNA 群集解析を行った。東シナ海のメタンプルームでは、明瞭な微生物密度異常もメタン酸化系統群の存在量も極めて少なく、同位体化学によりメタンの微生物酸化がほとんど生じていない結果と一致する。一方、深海域ではメタンの濃度異常が認められた水深の試料で、微生物細胞がその鉛直プロファイルから明瞭に増加していた。メタンプルーム試料中では熱水プルームで見いだされる SUP05 や SAR324 などの硫黄代謝系の微生物が見いだされるとともに、メタン酸化系統群は細胞密度やメタン濃度の増加が認められる水深で、*Methylobacterium*( ~ 5.6%) が優占系統群として見いだされ、熱水プルームとは異なる種類が優占していた。

## P-153

## 付加体の深部帯水層におけるメタン及び窒素ガス生成プロセスの地域特性

○松下 慎<sup>1</sup>, 石川 修伍<sup>2</sup>, 眞柄 健太<sup>2</sup>, 光延 聖<sup>3</sup>, 木村 浩之<sup>4</sup><sup>1</sup>静岡大・創造院環境, <sup>2</sup>静岡大・院理, <sup>3</sup>愛媛大・農, <sup>4</sup>静岡大・グリーン研

E-mail: matsushita.makoto.15@shizuoka.ac.jp

付加体は、海溝において海洋プレートが陸側プレートの下部に沈み込みこむ際、海洋プレート上部の海底堆積物がはぎ取られ、陸側プレートの側面に付加することで形成された厚い堆積層である。付加体の分布域は、西南日本の太平洋側、台湾、インドネシア、トルコ、NZにて見ることができる。付加体の深部帯水層には天水または海水に由来する豊富な嫌気性地下温水とともに、高濃度のメタン (CH<sub>4</sub>) や窒素ガス (N<sub>2</sub>) が存在している。しかし、これらの生成プロセスに関する知見はこれまでほとんど得られていない。本研究では、付加体が分布する静岡県中西部の太平洋沿岸部から山間部の地域に構築された大深度掘削井において、深部帯水層に由来する嫌気性地下温水と付随ガスを採取した。付随ガスの組成分析を行った結果、太平洋沿岸部に位置するサイト及び沿岸部と山間部の中間に位置するサイトからの付随ガスにはCH<sub>4</sub>が96%以上含まれている一方、山間部に位置するサイトからの付随ガスにはCH<sub>4</sub>とともに20～50%の割合でN<sub>2</sub>が含まれていることが示された。付随ガス中のCH<sub>4</sub>と地下温水中の溶存無機炭素の炭素安定同位体比分析の結果、太平洋沿岸のサイトの付随ガスには有機物の熱分解起源のCH<sub>4</sub>が、中間部と山間部のサイトの付随ガスにはメタン生成アーキアによる微生物起源のCH<sub>4</sub>が含まれていることが示唆された。地下温水中の微生物群集を対象としたCARD-FISH及びメタ16S rRNA 遺伝子解析の結果、水素資化性メタン生成菌、発酵細菌、脱窒細菌の優占が確認された。また、地下温水に有機基質を添加した嫌気培養を行った結果、中間部と山間部のサイトにおいて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る高いCH<sub>4</sub>生成ポテンシャルが示された。さらに、山間部のサイトの地下温水に有機基質と共にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>またはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>を添加した嫌気培養を行った結果、微生物脱窒によるN<sub>2</sub>生成ポテンシャルが確認された。本研究の結果より、太平洋沿岸部の付加体の深部帯水層では有機物の熱分解によるCH<sub>4</sub>生成が行われている一方、中間部と山間部の付加体の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が共生することで、堆積層中の有機物が分解され、CH<sub>4</sub>が生成されていることが明らかとなった。また、山間部の付加体の深部帯水層では微生物脱窒によるN<sub>2</sub>生成が同時に行われている可能性が示された。

## P-154

## 沖縄本島に分布する付加体の深部帯水層におけるメタン生成メカニズム

○眞柄 健太<sup>1</sup>, 松下 慎<sup>2</sup>, 佐藤 悠<sup>2</sup>, 石川 修伍<sup>1</sup>, 新里 尚也<sup>3</sup>, 木村 浩之<sup>4</sup><sup>1</sup>静大・院・総合, <sup>2</sup>静大・創造院, <sup>3</sup>琉大・熱帯生物研, <sup>4</sup>静大・グリーン研

E-mail: kenta.111760@gmail.com

静岡県中西部から中部, 紀伊半島, 四国, 九州, そして沖縄にかけての太平洋側の地域には, 付加体と呼ばれる厚い堆積層が分布している. 付加体は海洋プレートが陸側プレートの下に沈み込む際, 海洋プレート上の海底堆積物がはぎとられ, 陸側プレートに付加して形成された地質構造である. 付加体の堆積層には, 有機物が豊富に含まれている. また, 付加体の地下は砂層と泥層の互層からなり, 大量の嫌気性地下水が蓄えられた帯水層も存在する. さらに, 付加体の深部帯水層には大量のメタンが存在していることが報告されているが, そのメタン生成に関する知見は乏しい. 付加体によって形成された沖縄本島は周囲を海に囲まれており, その深部帯水層は海水の影響を受けていると考えられる. しかし, 深部地下水の流動に関する知見は不足している. そこで, 本研究では白亜紀から第三紀の海底堆積物に由来する付加体が基盤として分布する沖縄本島南部を調査し, そこに構築された4つの大深度掘削井にて地下温水と付随ガスを採取した. そして, 地下温水の環境データ測定, 付随ガスの化学分析, 付随ガスに含まれるメタンと地下水中の溶存無機炭素(主に $\text{HCO}_3^-$ )の炭素安定同位体比分析を行った. さらに, 地下温水に含まれる微生物群集の嫌気培養およびメタ 16S rRNA 遺伝子解析を試みた.

地下温水の塩濃度とイオン濃度から, 沖縄本島南部の深部帯水層は海水の影響を強く受けているサイトと, 天水の影響を受けているサイトの両方が存在することが示された. また, 採取した付随ガスにはメタンが93 vol%以上の割合で含まれていた. 炭素安定同位体比分析の結果から, 付随ガスには, 微生物起源のメタンが含まれていることが示された. 地下温水に含まれる微生物群集のメタ 16S rRNA 遺伝子解析の結果, 水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が優占していることが示唆された. また, 地下温水に有機物を添加した嫌気培養の結果, 水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌による水素ガスとメタンの生成が観察された. さらに, 本培養にて増殖した微生物群集においても水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が優占することが確認された. これらの結果より, 沖縄本島に分布する付加体の深部帯水層では, 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り, 堆積層中の有機物が分解され, メタンが生成されていることが明らかとなった.

## P-155

## 地下帯水層生態系における rare biosphere の群集形成に寄与する地球化学的要因

○山本 京祐<sup>1,2,3</sup>, Keith C. Hackley<sup>4,7</sup>, Walton R. Kelly<sup>5</sup>, Samuel V. Panno<sup>4</sup>, 関口 勇地<sup>6</sup>, Robert A. Sanford<sup>7</sup>, Wen-Tso Liu<sup>8</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>1,2,3,8,9</sup>

<sup>1</sup>産総研・生物プロセス, <sup>2</sup>筑波大・生命環境, <sup>3</sup>JST ERATO, <sup>4</sup>イリノイ州立地質調査所, <sup>5</sup>イリノイ州立水質調査所, <sup>6</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>7</sup>イリノイ大・地質, <sup>8</sup>イリノイ大・工, <sup>9</sup>東大・生セ

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

【目的】一般的に自然微生物群集は限られた種類の優占種と極めて多様な希少種 (rare biosphere) とで構成される。希少種はその存在量の少なさから、至適ではない生育条件下にあり生物活性は低いと考えられがちであったが、そうした希少種の中にも、活発に代謝をおこない群集全体の機能や構造に寄与するものが存在することが近年の研究で明らかとなってきた。しかし、希少种群集の形成過程や挙動を司る要因に関する知見は非常に少なく、特に、希少种群集の集合プロセスに化学パラメータなどの環境因子や地理的隔離といった中立な要因がどれほど寄与しているかについては未知の部分が多い。そこで本研究では、地下水生態系を対象として、希少種を含めた高解像度な微生物群集構造データと地理データおよび各種地球化学パラメータとの相関解析によって群集形成に寄与する各種要因について知見を得ることを目的とした。【方法・結果】米国イリノイ州東部、Mahomet 帯水層の 13 地点から地下水を採取し、微生物群集構造解析 (DNA/RNA ベースの Illumina MiSeq による 16S rRNA amplicon sequence) および化学成分分析を実施した。ほとんどのサンプルで DNA および RNA ベースの群集構造がよく一致し、希少种群集中にも一定の生物活性を有する系統群が検出された。群集構造の類似度から 13 の地下水サンプルは大きく 3 つのグループに分類され、希少种群集のデータ (各サンプル中で存在量 0.1% 以下の OTU) のみを用いて群集構造を比較しても同様のグループ分けとなった ( $p < 0.05$ )。その一方で、優占種のデータ (存在量 1.0% 以上の OTU) のみを用いて構造比較した場合では明確なグループ分けはみられなかった。3 つのグループはサンプルの地理的関係性を概ね反映していたが (西部、中央部、北東部)、全サンプル間の群集類似度に distance-decay 関係の傾向はみられず、地理的隔離による中立的な群集集合の寄与は弱いと考えられた。また、群集組成と化学パラメータとの相関を評価したところ、グループ分けは有機物 (Non-volatile organic carbon) や硫酸等の化学要因によって主に説明された。このように、希少种群集も一定の生物活性を有し、その群集形成に現場の化学パラメータが大きく寄与している可能性が示唆されたことから、群集全体の機能や構造変化を評価する際にも多様な希少种群集の機能・活性を勘案することが重要であると考えられる。



## P-156

### 地下水中におけるウイルスの原核生物群集制 II

○双木 笙太, 永翁 一代, 加藤 憲二

静岡大・院理

E-mail: namiki.shota.15@shizuoka.ac.jp

【今までに明らかになったこと】嫌氣的な地下圏において、ウイルスが原核生物群集の制御因子として果たす役割は大きいことが予想される。地下圏においてもウイルス様粒子 (virus-like particles: VLP) 数を明らかにした報告はなされているが、海洋や湖沼環境で明らかになっているようなウイルスと原核生物の相互作用を明らかにした報告はまだ殆ど例がない。そこで、富士山南麓の還元的な地下水を対象に、原生生物を除去しない培養区とサイズ分画によって原生生物を除去し、かつウイルス (V) と原核生物 (P) の接触頻度に倍の差を設けた2つの培養区 (接触頻度1と接触頻度2) を構築した。これらを120時間培養することで地下水中のウイルスが原核生物の数と群集構造に与える影響を評価した。前回大会では、原核生物の群集構造に関して綱レベルでウイルスの影響を報告したが、今回はさらに研究を進め、原核生物の属レベルでの群集構造と経時変化に着目した結果を紹介する。

【結果】擬似現場環境で行った4回の培養実験において、全ての培養区で培養48時間から72時間にかけて原核生物数が減少し、VLP数が増加したことからウイルスによる溶菌が起こったと推察される。培養後に16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス解析を行い、現場環境と培養後の原核生物の群集構造の変化を明らかにした。現場環境では *Alphaproteobacteria* 綱と *Betaproteobacteria* 綱が優占していた。接触頻度に差をつけた接触頻度1と接触頻度2の培養後では *Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱が優占するようになり、これらの分類群の割合が大きく異なった。特に、*Gammaproteobacteria* 綱の *Acinetobacter* 属と *Betaproteobacteria* 綱の *Limnolobus* 属の割合は実験毎に変化の傾向が異なっていた。これより、地下水中のウイルスは特定の分類群の群集構造に直接的あるいは間接的に影響を与えていることが推察される。この群集構造にウイルスが与える影響をより明確にするため、原核生物数とVLP数が大きく変化した培養48時間と72時間における接触頻度1と接触頻度2の群集構造の解析を進めている。

本研究により、地下水環境においてウイルスが原核生物の数と群集構造を制御していることが示唆された。また、ウイルスによる溶菌が地下圏における物質循環へと寄与している可能性も考えられる。



## P-157

海底堆積物に生息する微生物ダークマター *Chloroflexi* 門細菌の  
分離・培養

○中原 望<sup>1</sup>, 小西 優<sup>3</sup>, 高木 善弘<sup>2</sup>, 酒井 早苗<sup>2</sup>, 玉木 秀幸<sup>3</sup>, 山口 隆司<sup>1</sup>, 高井 研<sup>2</sup>, 井町 寛之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>長岡技大・院, <sup>2</sup>海洋研究開発機構 (JAMSTEC), <sup>3</sup>産業技術総合研究所 (AIST)

E-mail: s145023@stn.nagaokaut.ac.jp

海底堆積物環境は地球における重要な物質循環の場であり、その物質循環を担っているのが微生物である。16S rRNA 遺伝子を主体とした分子生態学的な解析から海底堆積物環境には系統分類学的に多種多様な微生物が生息し、それらの多くが未培養系統分類群に属することが明らかになっている。つまり、海底堆積物環境では微生物の代謝活動により物質循環が行われているにも関わらず、その反応を担う個々の微生物の詳細は殆ど理解されていないのが現状である。本発表では海底堆積物環境に優占して生息していることが遺伝子解析から予見されていた *Chloroflexi* 門の未培養系等群に属する 2 種類の嫌気性細菌の培養の成功と、これら細菌の生理・遺伝学的な特徴を報告する。培養に成功した *Chloroflexi* 門細菌は *Anaerolineae* 綱の新目を代表する細菌 (MO-CFX2 株, 分離済み) と *Dehalococcoidia* 綱の新目を代表する細菌 (MK-GIF9 株, 高度の集積培養系) である。これら 2 種類の細菌の分離あるいは集積培養には下降流懸垂型スポンジリアクターを用いた 3 ~ 5 年に渡る長期間の集積培養と数年間にわたるバッチ培養を組み合わせた方法により達成した。MO-CFX2 株は有機物を多く含む下北半島沖海底堆積物 (水深 1180m) から、MK-GIF9 株は紀伊半島沖のメタン冷湧水帯堆積物 (水深 2533m) から得た。これら細菌の増殖速度は極めて遅く菌体収量も低いために、1 回のバッチ培養に数ヶ月の時間を要した。そこで適切な培養条件を探し出すために、これら 2 つの培養系に対して (メタ) ゲノム解析を行った。得られたゲノム情報に基づき、培養条件の変更を行ったところ 2 つの細菌共に増殖速度および菌体収量を向上させることができた。この 2 種類の *Chloroflexi* 門細菌は糖類あるいはアミノ酸等を利用して発酵により生育することが可能であった。またゲノム解析および培養実験から MO-CFX2 株はハロゲン化合物を利用した嫌気呼吸する可能性が、MK-GIF9 株は硫黄化合物を利用して嫌気呼吸する可能性が示された。以上の結果からこれらの細菌は多様なエネルギー獲得様式を持っていることが強く示唆され、この多様な代謝を持つことが *Chloroflexi* 門細菌が海底堆積物環境で優占化する理由であると考えられた。

## P-158

### 深海底堆積環境におけるメタノールの嫌氣的分解

○柳川 勝紀<sup>1</sup>, 谷 篤史<sup>2</sup>, 山本 直弥<sup>2</sup>, 八久保 晶弘<sup>3</sup>, 狩野 彰宏<sup>1</sup>, 松本 良<sup>4</sup>, 鈴木 庸平<sup>5</sup>

<sup>1</sup>九大・比文, <sup>2</sup>阪大, <sup>3</sup>北見工大, <sup>4</sup>明治大, <sup>5</sup>東大

E-mail: kyanagawa@scs.kyushu-u.ac.jp

メタノールは揮発性有機化合物の中では研究の進んだ物質の 1 つである。環境中ではペクチンやリグニンなどのメトキシ基に由来してメタノールが作られ、それらはメタン生成の基質として使われることが知られている。しかしながら、深海底の嫌氣的環境下において、メタン生成以外の微生物活動がメタノールの濃度や挙動に与える影響についてはほとんど知られていない。そこで、日本海上越沖で取得された深海堆積物試料を対象に放射性同位体トレーサーを用いた超高感度活性測定法を実施したところ、メタノールが嫌氣環境で迅速に消費されていることが明らかとなった。今回の分析では、メタノールから二酸化炭素への分解活性、メタノールを用いたメタン生成、メタノールの同化、水素資化性メタン生成を測定した。これらの比較から、メタノールはメタン生成へ利用されるよりも、二酸化炭素に分解される反応が顕著であることが判明した。一方で、メタノールの総量に着目した場合、培養後に明確な減少は見られなかった。この理由として、微生物がメタノール消費に平行して堆積物中でメタノールを生成していたことが考えられる。本研究は、海洋堆積環境がメタノールのシンクのみならずソースとしても重要であることを示唆していた。

## P-159

## 山形県庄内沿岸汽水域堆積物に生息する嫌氣的メタン酸化微生物の活性および多様性評価

佐々木 捺実<sup>1</sup>, 曾田 直紀<sup>2</sup>, 塩澤 圭介<sup>1</sup>, 服部 聡<sup>1,2</sup><sup>1</sup>山形大・農, <sup>2</sup>山形大・院農

【目的】山形県庄内沿岸河口域（酒田市豊川）は海洋および河川の双方から有機物が流入する環境にあり、これらの有機物が蓄積することにより形成した堆積物は深さ約 1 m に達する。近年、当研究室は当該堆積物中に嫌氣的メタン酸化（AOM）活性を見出すとともに、メタン生成アーキアや硫酸還元細菌が存在していること等を明らかにしてきた。一方、堆積物深度ごとの AOM 活性や、上記微生物種が堆積物深度でどのように変遷するのか等、垂直活性・多様性分布に関する知見は未だ乏しい状況にある。そこで本研究では、これらを明らかにすることを目的とした。【方法】堆積物を垂直方向に採取後、深度ごとに 10 cm 間隔で切り出したものを供試試料とした。各々の試料を人工汽水の入ったバイアル瓶に添加懸濁後、<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>を気相部に充填、25℃でインキュベートした。AOM 活性評価は気相部を経時的に採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計で <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を測定することにより行った。なお、AOM 活性にメタン生成経路や硫酸還元経路が関与しているのか否かを明らかにするため、メタン生成阻害剤あるいは硫酸還元阻害剤存在下においても AOM 活性を測定した。メタン生成アーキアおよび硫酸還元細菌の多様性は、各深度堆積物から抽出したゲノム DNA を鋳型として、methyl-CoM reductase  $\alpha$  subunit (*mcrA*) 遺伝子および dissimilatory sulfite reductase  $\alpha$  subunit (*dsrA*) 遺伝子をクローニングすることにより評価した。【結果および考察】<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>による AOM 活性評価を行った結果、堆積物深度が深くなるにつれ、AOM 活性が増加した。また、メタン生成阻害剤および硫酸還元阻害剤存在下では、AOM 活性が著しく低下した。これらの結果から、当該堆積物における AOM 反応系はメタン生成経路の逆反応系かつ硫酸還元反応依存性であることが示唆された。機能遺伝子を用いた多様性解析においては、嫌氣的メタン酸化アーキア（ANME）が含まれる ANME-2a および ANME-3 group に属するクローンや、各種の硫酸還元細菌のクローンが堆積物深度に応じて検出された。以上の結果から、当該堆積物中では逆メタン生成能を有する ANME が硫酸還元細菌存在下で嫌氣的メタン酸化反応を行い得ることが示唆された。

## P-160

## 水溶性天然ガス田においてメタノール分解のみを担う新規メタン生成アーキアの分離同定

○持丸 華子, 玉木 秀幸, 吉岡 秀佳, 坂田 将, 鎌形 洋一

産総研

E-mail: h-mochimaru@aist.go.jp

【背景と目的】 商業的に重要とされる世界の油ガス田等の貯留メタンの少なくとも 20% は微生物活動により生産されたと見積もられている。このうち日本の水溶性天然ガスのほとんどは、堆積有機物の微生物分解により生成した生物起源のメタンであり、主に千葉県や新潟県から産出されている。これらのガス田には様々なメタン生成アーキアが活性を保持して存在していることを明らかとしてきたが、地層中のどのような有機物がどのような分解経路によりメタンへと変換されているのかについて多くは未解明である。本研究では、水溶性天然ガス田における堆積有機物の微生物分解メタン生成過程を明らかにすることを目的とし、新潟県のガス田から採取した試料を用いて、メタン生成アーキアに着目した系統解析を行い、検出された新規メタン生成アーキアの分離同定を行った。

【方法】 深度約 1000 m に貯留層がある新潟県の水溶性ガス井から、ガス、地層水、砂を嫌氣的に採取した。ガス中のメタンの炭素安定同位体比と地層水のイオン組成の分析を行った。砂試料を対象に 16S rRNA 遺伝子によるアーキアの菌相解析を行った。遺伝子解析により検出された新規メタン生成アーキアを分離培養し、温度、pH、塩濃度などの至適生育条件の特定、基質として利用可能な有機物の同定を行った。また、近縁のメタン生成アーキアを購入し、基質資化性について比較を行った。

【結果と考察】 メタンの炭素安定同位体比は  $-64.4\text{‰}$  で微生物起源のメタンであることが示唆された。遺伝子解析の結果 *Methanobacterium* 属、*Methanocalculus* 属、*Methanolobus* 属に近縁の配列が検出された。このうち *Methanolobus* 属に近縁のメタン生成アーキアの分離に成功し、その系統分類学的同定を行った。本アーキアの生育至適温度は現地温度に一致する  $40\text{--}45\text{°C}$  であり、至適 pH・塩濃度とも現地条件に一致した。*Methanolobus* 属には 8 種が知られており、いずれもメタノールとメチルアミン類を共に資化出来るが、本研究で分離したメタン生成アーキアは唯一メタノールのみを資化するものであった。このことから、堆積有機物分解メタン生成過程のメチル化合物分解経路においてメチルアミン類ではなく、メタノールの分解が重要であることが推察された。



## P-161

## 深部地下油層環境における生物的原油分解メタン生成メカニズムの解明

○眞弓 大介<sup>1</sup>, 玉澤 聡<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>, 坂田 将<sup>1</sup>, 五十嵐 雅之<sup>2</sup>, 若山 樹<sup>2</sup>, 前田 治男<sup>2</sup>, 米林 英治<sup>2</sup>, 飯田 剛史<sup>3</sup>, 大阪 典子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>産総研, <sup>2</sup>INPEX, <sup>3</sup>東京ガス

E-mail: mayumi-daisuke@aist.go.jp

【目的】近年、革新的な原油増進回収技術として枯渇油田に生息する微生物を活用した残留原油のメタン変換・回収技術が注目されている。その技術開発を達成するためには、深部地下油層環境における原油分解メタン生成反応のメカニズムを理解する必要がある。そこで今回、我々は国内油田から採取した油層試料を用いて、原位置の原油分解メタン生成ポテンシャルを評価する地球化学的分析および原位置環境を模擬する高温高压培養実験を行うことで、深部地下油層環境の原油分解メタン生成メカニズムの解明を試みた。

【方法】国内深部油田から油層水と原油、ガスを採取し、地球化学的分析として油層水中のイオン組成や原油の炭化水素組成、ガス状炭化水素や二酸化炭素の炭素同位体比を分析し、原位置の原油分解メタン生成ポテンシャルを評価した。一方で、採取した油層水と原油を用いて現場油層環境と同じ温度圧力条件の高温高压培養実験を実施し、原位置の原油分解メタン生成反応を実験室で再現した。

【結果】地球化学的分析の結果、当該油層環境は硝酸塩や硫酸塩などの電子受容体が枯渇し、原油の炭化水素成分やガス状炭化水素や二酸化炭素の同位体比から、原油炭化水素中の特に芳香族炭化水素が生分解を受けたメタン生成を伴う原油分解反応の兆候が観察された。一方で、現場油層環境を模擬する高温高压培養実験では、原油を唯一炭素源として計3度の継代培養（全培養日数：1000日）を行うことで、原油中のトルエンを分解するメタン生成微生物コミュニティの獲得に成功した。当該微生物コミュニティの群衆構造解析の結果、未培養の *Firmicutes* 門細菌や *Ca. Atribacteria* 門細菌、*Ca. Cloacimonetes* 門細菌が優占し、メタン生成菌としては水素資化性メタン生成菌や酢酸資化性メタン生成菌が検出された。

【考察】本研究では、地球化学的に原油分解メタン生成ポテンシャルが観察された油層試料を用いて現場油層環境を模擬する培養実験を実施することで、原位置の原油分解メタン生成反応を実験室で再現することに成功した。さらに、獲得したトルエン分解メタン生成微生物コミュニティは複数種の未培養細菌で構成されており、深部地下油層環境ではこれらの細菌とメタン生成菌による syntrophic network を介した原油分解メタン生成反応が進行していることが示唆された。



## P-162

### **Identifying methanogenic microbial community members obtained from 2-km deep seafloor coalbed**

○Eiji Tasumi, Tu Tzu-Hsuan, Akira Ijiri, Yuki Morono, Shun'ichi Ishii, Ken Takai, Fumio Inagaki, Hiroyuki Imachi

Japan Agency for Marine Science and Technology (JAMSTEC)

During the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Expedition 337, we successfully enriched a methanogenic microbial community from 2 km-deep lignite coalbed samples using a down-flow hanging sponge (DHS) reactor. During the DHS reactor operation for 932 days at near the in-situ temperature of 40° C, we observed a continuous methane production since the 7th day, even without adding any organic substrates in the seawater-based medium after 721 days. The carbon isotopic composition of methane gradually decreased with the operational time from -42.9‰ to -94.0‰, suggesting the significant contribution of microbial methanogenesis. Interestingly, the effluent contained acetate (up to 0.6 mM), which is most likely a major end-product of the heterotrophic microbial activity. Electron microscopic observation of the lignite particles showed that remarkably abundant and morphologically diverse microbial cells tightly attached to the particles. 16S rRNA gene-tag sequence analysis revealed that archaeal community was consisted mainly of a hydrogenotrophic CO<sub>2</sub>-reducing methanogen related to Methanobacterium. Bacterial community was predominated by the members within Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi and Gammaproteobacteria. Using the reactor enrichment as inoculum, subsequent batch-type cultivation led to the successful isolation of several anaerobic microorganisms, including the hydrogenotrophic methanogen. These data suggest that the enriched microbial community represents a heterotrophic microbial ecosystem that largely relies on coaly organic matter, and its activity produces both acetate and methane via the degradation of lignite.

## P-163

## IODP 東北地方太平洋沖地震調査掘削 (JFAST) で得られたコア試料の微生物解析

○酒井 早苗, 平井 美穂, 田角 栄二, 布浦 拓郎, 高井 研

海洋研究開発機構

東北地方太平洋沖地震および巨大津波を引き起こした原因を解明するため、統合国際深海掘削計画 (IODP) 第 343 次研究航海「東北地方太平洋沖地震調査掘削 (Japan Trench Fast Drilling Project: JFAST)」が実施され、東北地震時の断層すべり量が最も大きいと考えられた宮城沖日本海溝プレート境界断層浅部の掘削調査が地球深部掘削船「ちきゅう」を用いて行われた。本掘削では東北地震本震の震央から東南東約 93 km の海域に掘削地点が設けられ、実施目的の異なる 3 孔の掘削が水平距離 30 m の範囲内において行われた。その結果、海洋科学掘削における海面下コア試料取得深度 (海面下 7,734 m) の世界記録を樹立した他、プレート境界断層の構造や断層物質を用いた摩擦特性の調査、また孔内に温度計を設置し孔内温度を長期観測することによって断層残留摩擦熱を測定するなど様々な研究成果が得られている。本研究では、C0019E 孔より掘削されたコア試料の微生物学的特徴を明らかにするため、コア試料 (海底下約 180 m ~ 830 m のサンプル) を用いた微生物培養実験、放射性同位体を用いた活性測定、微生物群衆構造解析等を行った。その結果、海底下約 830 m まで微生物細胞が、海底下約 810 m までには微生物活性も検出された。なかでも、海底下約 700 m、720 m および 810 m のサンプルでは水素からの酢酸生成活性、海底下約 800 m のサンプルではメチルアミンからのメタン生成活性が検出され、この結果は現場の水素濃度およびメタン濃度の増大との関連性が見られた。加えて、微生物活性が確認されたサンプルを用いた培養実験においては嫌気性酢酸生成菌である *Acetobacterium* sp.、メチルアミンからメタン生成を行うメタン生成古細菌 *Methanolobus* sp. が培養されたことから、現場環境での酢酸生成およびメタン生成が強く示唆された。これらの海底下微生物群集は、東北地震のプレート境界断層の滑りではなく、より深部の震源域付近での岩石破壊によって生成し、地殻浅部に断層に沿って移動した水素によって活性化された地震生命圏である可能性も考えられる。

## P-164

**深海底での微生物現場培養実験から紐解く鉄を基盤とした海底下微生物圏：放射光源X線分析法を駆使した微生物による地殻内エネルギー獲得戦略の解明**

○大橋 優莉<sup>1</sup>, 光延 聖<sup>2</sup>, 坂田 昌弘<sup>1</sup>, 鈴木 優美<sup>3</sup>, 牧田 寛子<sup>4</sup>, 野崎 達生<sup>4</sup>, 川口 慎介<sup>4</sup>

<sup>1</sup>静岡県・院環境, <sup>2</sup>愛媛大, <sup>3</sup>神奈川工大院, <sup>4</sup>JAMSTEC

これまで生命活動が存在しないと考えられていた海底下に、多種多様な微生物が存在していることが最近の研究によって明らかとなってきた。特に、地球表面積の約70%を占める海底下の岩石圏に広大な地下生命圏が広がっている可能性が指摘され、地球生命科学に大きなパラダイムシフトが起こりつつある。岩石圏の生態系の一次生産者の微生物群がエネルギー獲得に用いる反応の1つとして、海洋地殻を構成する玄武岩やパイライトに含まれる2価鉄酸化反応がある。しかし、微生物による2価鉄酸化の反応機構には不明な点が多く、その理由は以下の3点に集約される。(1) 海洋微生物の99%以上は難培養性で、海洋性鉄酸化微生物も殆ど単離されていない。(2) 海底岩石圏と実験室レベルでの培養/実験条件にバイアスが生じやすい。(3) 採取した岩石試料は、現在だけでなく過去の風化イベント情報も含んでおり、現在の微生物相情報と岩石の酸化反応とを安易に関連付けられない。これらを考慮すると、海底下岩石圏生態系の理解には、実環境に近い条件で、一定期間、どのように微生物学的な鉄酸化が起きるのかを調べる必要がある。本研究では、深海底にて、2価鉄を含む固体基質であるパイライトを用いた微生物の現場培養実験を実施し、鉄酸化微生物の生態および生物学的な鉄酸化プロセスを調べることを試みた。2014年4月JAMSTEC研究航海において、パイライトの粉末/薄片試料を伊豆小笠原弧ベヨネース海丘海底の熱水域/非熱水域に設置した。設置の8ヶ月後および12ヶ月後に培養装置の回収航海を実施した。回収したパイライト試料の表面には、バクテリア、アーキアを含む多くの微生物および変質物が観察された。微生物相の16S rRNA解析の結果、パイライトサンプルでは培養実施周辺海域の堆積物と検出微生物種が大きく異なっていた。X線吸収微細構造(XAFS)法分析の結果、変質物には水酸化鉄鉱物であるフェリハイドライト、シュベルトマナイトが主要鉱物として観察され、基質表面は、周辺海水に比べ低pH環境であることが推察された。さらに走査型透過X線顕微鏡(STXM)を用いて、微生物-パイライト付着面の化学種分析をナノスケールで行った結果、微生物が金属錯生成能を有する細胞外有機物を鉱物表面で産生し基質の溶解を促進していること、また、水酸化鉄鉱物を50-100 nm程度の粒径を有するクラスター状にして細胞外へ排出していることが明らかとなった。

## P-165

## 異化的ヒ酸還元細菌によるヒ素ストレス応答機構の発現解析

○土屋 達哉<sup>1</sup>, 笠原 康裕<sup>2</sup>, 濱村 奈津子<sup>3</sup>, 天知 誠吾<sup>1</sup><sup>1</sup>千葉大院・園芸, <sup>2</sup>北海道大・低温科学研究所, <sup>3</sup>九州大・理学研究院

近年、微生物によるヒ酸 [As(V)] から亜ヒ酸 [As(III)] への還元反応が、帯水層などのヒ素汚染の原因であることが明らかになってきた。我々はヒ素汚染の原因菌の 1 つとして、国内水田土壌より異化的ヒ酸還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 の単離に成功している。このような細菌は、ヒ素ストレス下で特異な応答機構を発現すると予想されるが、網羅的な解析例はこれまでほとんどない。そこで本研究では、OR-1 株がヒ素存在下で発現するタンパク質を同定することを目的として、プロテオーム解析を行った。また、異化的ヒ酸還元酵素に対し、転写解析、酵素活性測定を行い詳細な解析を試みた。

OR-1 株を酢酸を炭素源、ヒ酸またはフマル酸を最終電子受容体として嫌氣的に生育させた。プロテオーム解析では、全タンパク抽出を行い 1D SDS-PAGE と LC-MS/MS を用いてタンパク質を同定した。ゲノムワイドで定量的な解析法を行うため、emPAI に基づいたラベルフリーな半定量的なプロテオーム解析アプローチを用いた。ヒ酸とフマル酸生育条件下でのプロテオーム解析において、それぞれ 985 個と 831 個のタンパク質が同定された。ヒ酸生育条件下では、フマル酸生育時と比較して、異化的ヒ酸還元酵素 ArrAB が高い発現量を示し、Arr の活性中心 molybdopterin の生合成系や亜ヒ酸排出に関わる ArsA の発現上昇も見られた。また、抗酸化酵素 (peroxiredoxin, rubrerythrin, rubredoxin)、ストレス応答 (UspA, Hsp90)、folding 関連タンパク質 (SurA)、分子シャペロン (ClpB, DnaJK, GrpE) などの発現上昇が確認された。ヒ酸生育時には、ヒ酸のアナログであるリン酸の transporter 関連タンパク質の発現上昇が見られ、硫黄代謝経路の活性化、特に thiol 基の再形成に関わる酵素が発現上昇していた。これは、亜ヒ酸と thiol 基の親和性が高いことに関連すると考えられた。また両生育条件下において RNA を抽出し RT-qPCR を行った結果、ヒ酸生育条件下において *arrA* の発現量がフマル酸生育条件下と比べて約 37 倍に上昇していることが確認された。さらに静止菌体を用いたヒ酸還元酵素活性測定より、ヒ酸生育条件下においてフマル酸生育条件下と比較して、7.57 倍の酵素活性が認められた。以上の結果から、OR-1 株は高濃度のヒ素に曝露されることで、異化的ヒ酸還元酵素を中心として、抗酸化酵素、分子シャペロンなどを協調的に発現上昇させ、ヒ素耐性を獲得することが示唆された。



## P-166

## 嫌氣的従属栄養性鉄酸化細菌の集積培養

細田 晃文, ○加藤 明穂, 井本 舞, 田村 廣人

名城大・農

E-mail: hosoda@meijo-u.ac.jp

これまで研究されてきた鉄酸化細菌は好酸性が多く、空気酸化との競合に依存しない中性環境で増殖する鉄酸化細菌の単離例はそれほど多くない。また、2価鉄はその性質から嫌氣的環境下では電子供与体となり得ることも知られている。本講演では、中性環境で塩化鉄を基質とした嫌氣的従属栄養性鉄酸化細菌の集積培養について報告する。鉄酸化細菌の接種源として製鉄会社から排出される含油スラッジ（5%油分含有）を用いた。オートクレーブ滅菌した *Geobacter* 培地（1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ）30 mL を含むブチルゴム栓付きバイアルに含油スラッジ 10 g を接種し、静置培養した。鉄酸化細菌の増殖基質には、含油スラッジより抽出した酸化鉄 0.5 g および酢酸（10 mM 酢酸ナトリウム相当）を電子供与体とした。3価鉄沈殿が認められた培養液を 10% (v/v) ずつ継代し集積培養を行った。また、鉄酸化細菌の純化を目指し上記の培地にて電気化学的培養（MEC：培地 200 mL, 接種源 10%, 22°C）を行った。MEC によって得られた細胞は、PAFe2N2 培地（5 mM  $\text{NaNO}_3$ , 5 mM  $\text{FeCl}_2$ , 5 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 0.6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM  $\text{KCl}$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , yeast extract 25 mg/L）を用いて再度、液体培養した。集積培養などの細胞増殖に伴う 2 価鉄の酸化量は、*o*-フェナントロリン法にて、酢酸の減少は電気伝導度計付き HPLC にて継時的に定量した。また、16S rDNA に基づく変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）により、集積培養液および MEC の鉄酸化に関わる細菌群集を解析した。塩化鉄 (II) を用いた集積培養および MEC により酢酸を資化するのと同時に 2 価鉄を酸化する嫌氣的な集積培養物を得た。培養 12 日間における 2 価鉄の酸化率は 0.29 mM/日、この時の酢酸は 1.1 mM 資化され、pH の上昇が認められた。集積培養液および MEC の DGGE 解析から、鉄酸化に関わる細菌は、硝酸依存性の嫌氣的鉄酸化細菌として報告がある *Acidovorax* 属に近縁（99% 相同性）であることが明らかとなった。今後は、この菌株の単離と生理的特性解析を行う予定である。



## P-167

## 硫酸塩・Fe(III)還元を伴う嫌氣的トルエン分解微生物群集の構造解析

○佃 怜奈<sup>1</sup>, 牧 大智<sup>1</sup>, 高見澤 一裕<sup>2</sup>, 中村 浩平<sup>2</sup><sup>1</sup>岐大・院応生科, <sup>2</sup>岐大・応生科

E-mail: v8121024@edu.gifu-u.ac.jp

石油はエネルギー源や化学製品の原料として広く用いられており、我々の生活に欠かせない存在である。一方で、多量の石油の生産と消費に伴い、原油の採掘・輸送・精製過程からの流出や漏出などによる環境汚染が数多く発生している。環境中に漏出した石油系炭化水素は、直接摂取することによる生体への有毒性のほかに、油膜や油臭を引き起こすことから、生活や経済活動の支障となる。石油由来の芳香族化合物の中でも毒性と地下水への拡散のしやすさから、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン(総じてBTEX)は、土対法や化管法の対象物質である。BTEX汚染の浄化法としてバイオレメディエーションが挙げられる。特に、嫌気環境でBTEXを分解する細菌は*in situ*での浄化に効果的であると考えられ、それらの細菌の応用のためにより多くの知見が必要である。本研究では、原油湧出地の微生物群集に注目し、トルエン存在下で異なる電子受容体条件下で培養した微生物群集構造を比較し、嫌氣的トルエン分解機構の解明を試みた。

原油湧出地の泥を植菌源に、電子供与体としてトルエン、電子受容体に硫酸塩またはFe(III)を添加した嫌氣的トルエン分解培養系を構築した。それぞれの電子受容体条件下でトルエンと硫酸塩の減少およびFe(II)の増加を確認した。培養系からDNAを抽出し、MiSeqによるメタ16S rDNA解析および嫌氣的トルエン分解の初発反応に関わる機能遺伝子*bssA* (ベンジルスクシネートシンターゼ $\alpha$ サブユニット)を標的としたクローンライブラリー解析を行った。メタ16S rDNA解析の結果、硫酸塩添加系では硫酸塩還元トルエン分解細菌として報告されている*Syntrophobacteraceae*科細菌、Fe(III)添加系では*Geobacter*属細菌がそれぞれ優占種(総リードあたり57、83%)であった。一方*bssA*遺伝子では、硫酸塩、Fe(III)添加系ともに*Geobacter*属細菌由来の遺伝子が多数を占め(総クローン数あたり71、100%)、それぞれの配列は99%相同であった。したがって両系ともに*Geobacter*属細菌がトルエン分解の初発反応を担うと推定されるが、硫酸塩添加系の*Geobacter*属細菌の16S rDNAの割合は0.7%未満であった。これらの事実から、存在量の低い*Geobacter*属と優占種である*Syntrophobacteraceae*科細菌の連携による硫酸塩還元を伴うトルエン分解が考えられた。更に両系で未培養*Betaproteobacteria*綱細菌の16S rDNAが検出され、本菌のトルエン分解への関与が示唆された。

## P-168

### Microorganisms on iron mineral particles in the Fe(II) rich hot spring

○ Airi Idei<sup>1</sup>, Katsumi Matsuura<sup>1</sup>, Shawn E McGlynn<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Bio., Tokyo Metropolitan Univ., <sup>2</sup>Earth-Life Sci. Inst., Tokyo Tech.

E-mail: idei-airi@ed.tmu.ac.jp

Iron rich environments have been studied as model systems analogous to the ancient sea, and are valuable for understanding the involvement of microbial activities on ferrous iron oxidation. Most previous studies did not focus on iron oxidizing bacteria in high temperature, and in general iron mineral deposition seems to be a restricted physiology. In this study, the characteristics of microorganisms in mineral deposition were examined in an iron rich hot spring for the model. The sampling site was Jinata hot spring in Shikine-jima. There were 4 pools, which are connected by channels. We focused on the two different environments, pool 1 and 2. The spring source containing Fe(II) was 62°C in pool 1. The pH was 5.4. The pool 2 was 45-56°C, pH 6.3. In both pools, muddy orangish sediment due to iron oxide was observed. Pool 1 had red streamers, which were flapping in the flow. In pool 2, there are layers, a green mat, an iron mineral layer, and a black layer in this order from the surface. There were more cells in the streamer than in the sediment, and cyanobacteria could also be observed by fluorescence microscopy. In the green mat, filamentous cyanobacteria were found. In the black layer, unicellular cyanobacteria were observed. The *psaA* gene analyses showed that the filamentous cyanobacteria are related to *Leptolyngbya* sp. and the unicellular cells are related to *Pleurocapsa* sp. Minerals in the streamers and particles were examined by SEM-EDS, and typical composition was C 10%, O 62%, Mg 1.1%, Si 4%, Fe 16%. The mats contained less Mg and Si and the black layer contained Mn. Thus, significant amounts of microorganisms were observed on iron particles and streamers, possibly involving in the formation of the sediments. The streamer may have microorganisms related to oxidize ferrous iron directly. The presence of cyanobacteria suggests that evolved oxygen may also involve in the sedimentation.

## P-169

## 現場培養による深海性鉄利用微生物の解明

○鈴木 優美<sup>1,2</sup>, 牧田 寛子<sup>2</sup>, 光延 聖<sup>3</sup>, 大橋 優莉<sup>4</sup><sup>1</sup>神奈工大・院工, <sup>2</sup>JAMSTEC, <sup>3</sup>愛媛大・農, <sup>4</sup>静岡県大・院薬食

鉄は、海底地殻を構成するバサルト(玄武岩)に含まれる金属のうち、アルミニウムに次いで含有量が多く、地球上に多量に存在する金属元素である。また、多くの生物にとって必須元素であり、利用されやすいことから、有機物が乏しく光の届かない深海環境では、微生物にとって主要なエネルギー源の一つと考えられる。これまでに鉄をエネルギー源とする微生物の存在は明らかとなっているが、その生態や生化学的性状が明確になった深海性鉄利用微生物はごく僅かである。本研究では、深海底にて鉄鉱物の現場培養実験を行い、一定期間後に回収した鉄鉱物試料中の微生物叢を分子生物学的手法にて解析することで、深海環境における鉄鉱物中の固体状の鉄をエネルギー源として利用する微生物種を明らかにすることを目的とした。鉄鉱物試料として、深海環境に豊富に存在するパイライト(FeS<sub>2</sub>)を使用した。パイライトの粉末を孔径 40 μm のフィルターで包み、現場培養装置に取り付け、小笠原弧ベヨネース海丘の熱水活動域、非熱水域にそれぞれ設置した。8ヶ月および12ヶ月間現場培養後、回収した鉄鉱物試料からDNAを抽出し、分子生物学的手法を用いて微生物叢の解析を行った。また、現場培養実施地点周辺の海底堆積物に対しても同様の解析を行った。さらに、実験室にて現場培養地点の海底堆積物を植種源とし、パイライトをエネルギー源とした培養実験を実施した。パイライト試料の微生物群集構造解析の結果、優占して検出された微生物のうち、*Magnetospirillum*の近縁種が鉄を利用できることが分かった。この微生物は磁性細菌であり、体内に磁石を生成する際体外から鉄を取り入れることが知られている。この種以外にも磁性細菌が数種検出されており、これらが深海底でパイライト中の固体状の鉄を利用していると考えられた。検出された微生物叢は堆積物とパイライト試料とでは大きく異なっており、パイライトを利用する微生物を選択的に検出できたと考えられた。なおパイライト試料から検出された微生物由来の16S rRNA遺伝子の殆どが、既知の微生物との相同性が90%程度と低く、新種の微生物である可能性が示唆された。実験室での培養実験の結果からは、エネルギー源としてパイライトを利用した微生物の増殖が観察された。本発表では、現場環境および実験室内での培養実験によって得られた、深海環境に生息する鉄利用微生物の新しい知見について報告する。

## P-170

### 土壌環境のヒ素挙動に関与する微生物群集機能の解明

○濱村 奈津子<sup>1</sup>, 片岡 剛文<sup>2</sup>

<sup>1</sup>九州大・院理, <sup>2</sup>福井県大・海洋資源

E-mail: nhamascb@kyushu-u.org

猛毒のヒ素は、鉱山開発など人為的な汚染源の他に、鉱物や掘削ずりからの溶出など自然汚染源からも環境中に放出され、現在、世界でもっとも深刻な汚染物質の一つである。亜ヒ酸 (AsIII) はヒ酸 (AsV) と比べ土壌中での移動性および生体毒性が高いため、反応速度の高い微生物代謝によるヒ素の形態変化は、環境挙動に影響し汚染リスクを悪化させる要因と考えられている。実際の汚染土壌でヒ素は他の重金属等と混在することが多いが、複合汚染環境における微生物群集の代謝機能やヒ素動態を明らかにした総合的な研究は極めて稀少である。そこで本研究では、汚染土壌カラムを用いて、ヒ素と同族毒性元素アンチモンの複合曝露がヒ素形態変化に及ぼす影響を明らかにするとともに、土壌微生物群集における遺伝子発現応答の推移をメタトランスクリプトームで網羅的に解析し、ヒ素挙動に関与する機能発現の定性定量的検出を試みた。AsIII (0.2 mM) 添加後の土壌カラムではAsIII酸化能が上昇し7日後には100%に達したが、その後3価アンチモン (SbIII) を複合曝露した系では、AsIII酸化能が40%以下に減少した。メタトランスクリプトーム解析では、rRNA配列に基づく群集組成がSbIII複合曝露後に大きく推移するのに対し、機能遺伝子群の発現パターンは曝露直後には特異的な応答を示すが、その後SbIII非添加の系と類似した発現パターンが見られた。さらに、qRT-PCRによるヒ素酸化酵素遺伝子 (*aiOA*) の定量解析およびヒ素代謝細菌の分離培養の結果から、SbIII複合曝露直後には存在する微生物群による応答反応が見られ、その後複合曝露の系ではSbIIIに耐性を示すがヒ素代謝活性速度の異なるヒ素酸化細菌が出現したため、全体でのAsIII酸化能が減少したと考えられた。以上より、多種多様な微生物が混在する複雑系においては、環境変化への応答や代謝特性の異なる菌叢への推移も考慮した、より詳細な遺伝子型に特異的な定量的発現診断に基づく微生物群集全体のヒ素代謝活性変動を予測する必要性が示唆された。

## P-171

### 深海熱水活動域での酸化鉄被膜形成に関わる微生物

○牧田 寛子<sup>1</sup>, 田中 英美子<sup>2</sup>, 菊池 早希子<sup>1</sup>, 光延 聖<sup>3</sup>, 鈴木 優美<sup>2</sup>, 関野 優也<sup>2</sup>, 大橋 優莉<sup>4</sup>, 高井 研<sup>1</sup>

<sup>1</sup>JAMSTEC, <sup>2</sup>神工大・工, <sup>3</sup>愛媛大・院, <sup>4</sup>静岡県大・院

E-mail: makita@jamstec.go.jp

世界各地の海洋環境において、酸化鉄で覆われた海底面（酸化鉄被膜地帯）が確認されている。それらは、環境中の鉄を直接的あるいは間接的に利用する微生物により形成された微生物と鉱物（主に酸化鉄）の複合体であり、それらの複合体（酸化鉄被膜）は、鉄利用微生物の生理・生態を理解する上で最適な試料であると考えられている。海洋性の鉄利用微生物は、海洋地殻に含まれる鉄の総量を踏まえると、圧倒的な存在量を誇る事が予想され、光の届かない栄養の乏しい環境での生態系を支える重要な一次生産者であると考えられる。この仮説に基づき、鉄利用微生物の一次生産活動や物質循環における役割が注目されるようになり、近年各地の酸化鉄被膜地帯での微生物調査が実施されている。我々はこれまでに、沖縄トラフ、マリアナ島弧、南部マリアナトラフそして伊豆小笠原弧の深海熱水活動域に存在する酸化鉄被膜の微生物学的調査を行ってきた。本発表では、微生物群集構造解析から予想される、酸化鉄被膜形成に関わる海洋性鉄利用微生物の生態と培養によって明らかとなった新規鉄利用細菌の生化学的性状について報告する。



## P-172

# 電気産生微生物群集における電極の酸化還元電位の変化に対する多様な遺伝子発現応答

○石井 俊一<sup>1,3</sup>, 鈴木 志野<sup>1,2,3</sup>, Kenneth H. Nealson<sup>2</sup>, Orianna Bretschger<sup>3</sup>

<sup>1</sup>海洋研究開発機構, <sup>2</sup>南カリフォルニア大, <sup>3</sup>J. Craig Venter Institute

E-mail: sishii@jamstec.go.jp

微生物は通常、有機物を酸化し、電子受容体を還元する事によりエネルギーを獲得し、呼吸している。その中でも、菌体外電子輸送 (Extracellular electron transfer, EET) による固体状の電子受容体の還元は、一つの重要な呼吸形態である。しかしながら、実環境中では、様々な酸化還元電位を示す固体状の電子受容体 (酸化鉄など) が存在し、微生物がどのようなメカニズムで異なる酸化還元電位を持つ固体表面に電子を輸送するのかは明らかになっていない。そこで本研究では、ショ糖を分解し発電する電気化学バイオリアクター中で、固体状の電極表面を異なる三つの酸化還元電位に制御し、電気産生微生物群集の電子フローおよび代謝フローを同定した。我々は、新たに開発された刺激応答型メタトランスクリプトーム法を用い、電極電位の変化に伴って微生物およびその遺伝子がどのように発現応答をするかを解析した。まず、三つの電気産生微生物群集のメタゲノムから、55種の微生物株のドラフトゲノムを作成し、その中から *Geobacteraceae* に属する9種の発電菌のドラフトゲノムを同定した。その後、3種の異なる EET 刺激 (高い酸化還元電位、電子輸送ストップ、ショ糖の有無) を加え、各微生物株の遺伝子発現応答を解析した。すると、9種の *Geobacteraceae* 株に、明確な酸化還元電位の依存性、基質レンジ (水素、ギ酸、酢酸、エタノールなど) の相違、そして菌体外電子輸送に関わるマルチヘム型のシトクロームCのプロファイルの違いが確認された。これらの結果により、電気産生微生物群集中の発電菌には、多様な生物学的地位 (ニッチェ) が存在し、特に、固体表面の酸化還元電位は、発電菌の選別における大きな選択圧となっている事が示された。

## P-173

# 電極上に形成されるシュワネラ菌のバイオフィームと電極電位の関係

○北山 実穂, 高妻 篤史, 渡邊 一哉

東葉大・院生命

E-mail: s116079@toyaku.ac.jp

【背景・目的】シュワネラ菌 (*Shewanella oneidensis* MR-1 株) は、多様なエネルギー代謝を行うことができる細菌である。また、グラファイト電極を電子受容体として利用できることから、微生物燃料電池におけるモデル細菌として世界的に広く研究されている。これまでの研究で、MR-1 株は発電時に電極上にバイオフィームを形成することが知られている。そこで本研究は、電極電位や電流量とバイオフィーム構造にはどのような関係があるのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】発電時のバイオフィーム形成過程を観察するため、基板にグラファイト電極を用いたフローセルを作製した。また、嫌気条件でも蛍光を発する緑色蛍光タンパク (GFP) を構成的に発現する MR-1 株を構築した。バイオフィームの三次元構造の経時的観察には、正立型共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

【結果・考察】発電条件 (電極電位 +0.2 V vs Ag/AgCl) および非発電条件 (好気条件) におけるバイオフィームの比較を行った所、非発電条件には厚く部分的に大きく盛り上がったバイオフィームが観察された。一方発電条件においては、薄く均一なバイオフィームが観察され、非発電時のバイオフィーム構造とは大きく異なることが明らかになった。さらに、高電極電位 (+0.2 V) と低電位 (-0.2 V) でのバイオフィーム構造を比較したところ、電極電位は電流量やバイオフィーム厚に影響を及ぼすこと (例えば、バイオフィーム厚が 6  $\mu$  m 時の電流密度は高電位で 8.8  $\mu$  A/cm<sup>2</sup>、低電位で 1.5  $\mu$  A/cm<sup>2</sup>) が示された。同時にバイオフィームの構造と細胞外多糖 (EPS) の局在を調べた所、高電位条件では薄く均一なバイオフィームが形成され、EPS が均一に局在することが明らかになった。一方、低電位条件では部分的にバイオフィームが小さく盛り上がり、その盛り上がりの部分に EPS が局在していた。これらの結果から、電極電位が電流生成量に影響を及ぼす過程の一つとして、バイオフィーム構造の変化が含まれることが明らかになった。今後、バイオフィーム形成と電流生成のより詳細な関係を明らかにする予定である。

## P-174

## 海洋単離株 FT01 は金属腐食を引き起こして鉄飢餓状態を脱する

○渡辺 宏紀<sup>1</sup>, 稲葉 知大<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>3</sup>, 宮野 泰征<sup>4</sup>, 野村 暢彦<sup>3</sup><sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>産総研・環境管理, <sup>3</sup>筑波大・生命環境系, <sup>4</sup>秋田大・理工

E-mail: hiroki050507@gmail.com

微生物金属腐食を引き起こす原因菌として硫黄酸化細菌, 硫酸塩還元菌やメタン生成菌が主要なものとして知られている。しかし, 近年ではそれらの細菌が存在せずとも微生物金属腐食と考えられる現象が見られており, 原因の特定が困難であることから問題となっている。微生物による金属腐食部では細菌が自身の代謝産物である細胞外マトリクスを身にまとったバイオフィーム (BF) の形成が観察されている。しかし, 微生物金属腐食と BF の関係についての知見は少ない。先行研究において千葉県富津湾より単離された細菌 FT01 は金属腐食能を有することが明らかとなった。共焦点顕微鏡により FT01 は自然海水中でステンレス表面上に立体的な BF を形成し, BF 下のステンレス表面には腐食孔と推測される孔が観察された。興味深いことに 16S rRNA 解析により FT01 の属を決定したところ, 本属菌による微生物金属腐食の報告は無かった。当研究では FT01 の形成する BF と金属腐食現象に何らかの関係があると考え, FT01 の金属腐食メカニズムの解明を目的とした。主な解析手法として COCRM 法や CLSM 法などの顕微鏡手法を用いた。

海水模倣培地中で培養した場合, 自然海水を培地として用いた際と比較して, 立体的な BF の形成は見られず, ステンレス上における腐食孔も観察されなかった。自然海水中においては鉄イオンが枯渇することが知られているため, 海水模倣培地の組成から鉄化合物を除いた培地で同様の観察を行った。ステンレス非存在下では FT01 の生育は見られなかったが, ステンレスを浸漬すると FT01 の生育の増加が観察された。さらに, ステンレス表面には立体的な BF の形成がみられ, BF 下には腐食孔が観察された。この結果から FT01 は鉄飢餓状態において, 腐食により溶出した鉄イオンによって生育していることが示唆された。次に, 培養ウェルに孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルター付きインサートを設け, FT01 のステンレス表面への直接付着を阻害したところ, FT01 の生育の増加およびステンレス表面における腐食孔は観察されなかった。このことから, 腐食孔の形成にはステンレス表面上への FT01 の直接接触および BF の形成が必須であると考えられる。以上のことから, 鉄飢餓状態に陥った FT01 はステンレス表面への直接接触および BF の形成により腐食を誘導し, 溶出した鉄イオンによって生育を可能としていると考えられる。

## P-175

### 発酵的 ATP 合成を行う嫌気呼吸： *Shewanella oneidensis* MR-1 における細胞外電子移動

○徳納 吉秀<sup>1</sup>, 橋本 和仁<sup>2</sup>, 岡本 章玄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大・院工, <sup>2</sup>物質材料研究機構

E-mail: tokunou@light.t.u-tokyo.ac.jp

ある種の微生物は、代謝生成した電子を細胞外の固体まで伝達させる「細胞外電子移動 (Extracellular Electron Transfer, EET)」を可能とし、近年その機構が盛んに研究されている。プロトン濃度勾配を形成する役割を持つ内膜電子伝達系に対して、EETにおける外膜にまで伸長された電子伝達鎖では、エネルギーを獲得する機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、EETを行うモデル鉄還元細菌である *Shewanella oneidensis* MR-1 を用いてプロトンの局在性や速度論に関する検討を行った。EETを介した嫌気呼吸での ATP 合成経路を調べるため、プロトン濃度勾配から ATP を合成する F-ATPase を欠損させた *S. oneidensis* MR-1 変異株と野生株の増殖速度を比較した。プロトン濃度勾配を利用して合成した ATP を主なエネルギー源とする好気呼吸条件の下培養した際には、予想通り欠損株の増殖速度は大きく低下した。一方で、電極を用いて定電位を印加した EET 呼吸の場合には、驚くべきことに欠損株は野生株と同等の増殖速度を示した。以上の結果は、EET が通常の電子伝達系を用いた呼吸と異なり、プロトン濃度勾配を利用した ATP 合成を行っていないことを示している。さらに、発酵において基質レベルのリン酸化による ATP 合成に用いられる酵素 (Pta, AckA) を欠損させた際には、EET 呼吸での著しい増殖速度の低下が認められた。すなわち EET は、電子伝達系を用いる呼吸であるにもかかわらず、発酵的な ATP 合成経路によってエネルギーを獲得していることが強く示唆された。これは同時に、内膜電子伝達系においてペリプラズムまで汲みあげられたプロトンが、ATP 合成に用いられず、細胞外に排出されている可能性を示している。当日は、この仮説検討のために行った重水添加による速度論的同位体効果の詳細について発表する。



## P-176

### Bacillus 属細菌による金属腐食の解析

○山本 達也, 野村 暢彦

筑波大・生命環境

微生物による金属腐食による経済的損失は年間30から50億ドルにもなると報告されており、重大な問題となっている。微生物金属腐食の原因としてメタン生成細菌や硫黄酸化細菌、硫黄塩還元細菌が主要な要因であると報告されているが、それらの細菌が存在しない場合にも腐食が見られており、未だ微生物腐食には不明な点が多い。本研究では土壤中に多く存在する *Bacillus* 属細菌について金属腐食を引き起こすか解析した。*Bacillus* 属細菌を合成培地、合成培地から鉄成分を除いた培地及びその培地にステンレス片を入れた培地に植菌し、24 wellプレートにて培養した。その結果、合成培地ではペリクル型のバイオフィルムを形成していたのに対し、鉄成分を除いた培地ではバイオフィルム形成は見られなかった。一方、ステンレス片を加えたものでは合成培地以上にバイオフィルムを形成していた。また、培地にステンレス片のみを加え、2日静置し、培地のみを回収し、その培地を用いて培養したところ、バイオフィルム形成は見られなかったことから、*Bacillus* 属細菌はステンレスから積極的に鉄を獲得し増殖していることが示唆された。また、合成培地の鉄濃度を变化させたところ、鉄濃度が増加するほどバイオフィルム量が増加していたことから、*Bacillus* 属細菌は通常の合成培地に添加している鉄濃度以上にステンレスから鉄を獲得していると考えられた。金属腐食が起きているか共焦点レーザー顕微鏡を用いて、解析したところ、植菌していないステンレス片では腐食が見られなかった一方、植菌したものでは腐食が観察された。以上のことから、土壤に普遍的に存在する *Bacillus* 属細菌においても金属腐食が生じることが示された。



## P-177

## 炭素材料の酸化による汚水からの生物学的電流回収の促進

○吉田 奈央子<sup>1</sup>, 宮田 康史<sup>2</sup>, 麦田 藍<sup>3</sup>, 飯田 和輝<sup>3</sup><sup>1</sup>名工大・院工, <sup>2</sup>名市工研, <sup>3</sup>日本工営

E-mail: yoshida.naoko@nitech.ac.jp

【目的】我々は、黒鉛を化学的に酸化した炭素原子 1 層のシート状分子である酸化グラフェン (Graphene oxide、以下 GO) を電子受容体とした嫌気培養により、GO 還元物 (rGO) によって電流生産微生物を集積・捕捉したアノードを作成できることを示してきた。本研究では、この rGO-微生物複合体を微生物燃料電池 (以下 MFC) 型廃水処理装置のアノードとして利用することを目的として、実廃水をエネルギー源とした培養により rGO-微生物複合体を形成可能か、本複合体を用いて実廃水をエネルギー源とした電流回収が可能か試みた。

【方法】rGO-汚泥複合体は、1L の嫌気槽水に対し 67mL の 10 g/L GO を混ぜた後 28℃ で 2 週間～1 ヶ月静置培養して作成した。対照として用いた黒鉛フェルトは、rGO 複合体と同様の大きさにカットし、この電極に 1L の嫌気槽水を遠心濃縮した 10mL の溶液を注入し rGO 複合体に供したバイオマス量をそろえた。定電圧培養は、900ml 容積の蓋付きガラス瓶内に、参照電極 (Ag/AgCl)、対電極 (白金線)、集電体として  $\phi$  3.0cm、高さ 1.0cm の白金線で作成した籠を集電体として設置し、籠内に rGO または GF を取り付けて行った。

【結果】嫌気槽水と GO を混合培養した結果、ゲル状の 23 mS/cm の導電性をもつ複合体が形成されることが示された。rGO-汚泥複合体の汚水中における電流生産試験を 23 日間行った結果、rGO 複合体における電流生産のピークは、179 - 310  $\mu$  A/cm<sup>3</sup> であり、GF 複合体の 2 - 3 倍程度であった。COD 除去速度は、rGO 複合体と GF 複合体との間で大きな差はなく、0.48 - 1.2 mg/d/cm<sup>3</sup> であった。生産電流と除去 COD からクーロン効率を求めた結果、rGO 複合体は 30 ? 110 % のクーロン効率を示し全体を通して GF 複合体のクーロン効率 (17 ? 52%) に比べて高かった。さらに、この培養前後の容器内バイオマスを直接検鏡法により計測した結果、rGO 複合体での複合体における細胞捕捉率は全細胞数の 38% (GF では 14%) であり、同化率は 6.8 ? 10<sup>6</sup> cells/mg-COD と見積もられ、GF 複合体を用いた場合の同化率 (7.6  $\times$  10<sup>7</sup> cells/mg-COD) の 1/10 程度であった。16SrRNA 遺伝子アンプリコン解析の結果、両複合体とも *Geobacter* 属細菌を優占種とした類似した群集を有した。顕著な違いとして、rGO 複合体では *Desulfarculaceae* 科 (12%)、*Geothrix* 属 (7.6%) が多く検出された。総じて、rGO 複合体では、GF 複合体に比べ多様な電流微生物の増殖を促すと考えられた。

## P-178

特定波長の太陽光線が海洋に遍在する *Thaumarchaeota* 門古細菌の有光層における分布へ与える影響の評価

○伊知地 稔<sup>1</sup>, 塩崎 拓平<sup>2</sup>, 藤原 周<sup>2</sup>, 眞壁 明子<sup>1,2</sup>, 吉川 知里<sup>2</sup>, 川口 慎介<sup>2</sup>, 西野 茂人<sup>2</sup>, 原田 尚美<sup>2</sup>, 木暮 一啓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大・大海研, <sup>2</sup>JAMSTEC

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

窒素は海洋の基礎生産を律速する最大の要因であり、窒素循環により供給される硝酸態窒素が重要な窒素源である。硝酸態窒素を供給する唯一の生物過程である硝化は、アンモニア酸化と亜硝酸酸化の過程から成る。硝化を律速するアンモニア酸化の主要な担い手は、独立栄養性無機化学合成古細菌であり、その属する古細菌のグループ（現在は *Thaumarchaeota* 門という名称が提案されている）が全海洋の原核生物数の約 20%、深海の 40-50% を占めると推定されている。さらに、無機化学合成生物である *Thaumarchaeota* 門古細菌は基礎生産者であり、現場観測の培養法や非培養法による研究から炭素循環へも寄与しているという知見が得られている。海洋に遍在している *Thaumarchaeota* 門古細菌であるが、有光層上部では有光層下部と比較し桁違いに現存量が少ない。この現象は太陽光線によって *Thaumarchaeota* 門古細菌の呼吸であるアンモニア酸化が阻害されるためであり、海洋分離株に白色光を照射する培養実験から、強光下ほどアンモニア酸化が阻害されると報告されている。故に、光阻害が *Thaumarchaeota* 門古細菌の現存量に影響すると考えられている。しかし、既往研究や申請者の研究で、*Thaumarchaeota* 門古細菌の現存量が有光層上部で有光層下部と比較し桁違いに少ない海域と、同等な海域が報告されている。強光による光阻害が原因であるとする、現存量が有光層上部でも有光層下部と同等な海域の存在を上手く説明できない。一方で、淡水湖の堆積物から分離された *Thaumarchaeota* 門古細菌は、特定の波長の光でのみアンモニア酸化が阻害されるという報告がある。そして、太陽光線は波長によって到達する水深が異なるので、単純な光強度ではなく、特定波長の光強度が *Thaumarchaeota* 門古細菌の分布に影響している可能性がある。つまり、特定波長の光が到達する有光層上部以浅で *Thaumarchaeota* 門古細菌の現存量が少ないのではないか？本発表では、現場観測による鉛直的な光の波長および光強度と、*Thaumarchaeota* 門古細菌の現存量および硝化活性の変化の関係から、どの波長の光が *Thaumarchaeota* 門古細菌の有光層における分布に影響しているかを報告する。

## P-179

## 海洋性フラボバクテリアにおける、プロテオロドプシンを介した光利用と光防御のトレード・オフ

○熊谷 洋平<sup>1</sup>, 吉澤 晋<sup>1</sup>, 小椋 義俊<sup>2</sup>, 林 哲也<sup>2</sup>, 木暮 一啓<sup>1</sup>, 岩崎 渉<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>東京大学 大気海洋研究所, <sup>2</sup>九州大学 医学研究院 基礎医学部門,

<sup>3</sup>東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻, <sup>4</sup>東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

バクテロイデス門細菌は海洋表層においてプロテオバクテリア、シアノバクテリアに次ぐ優占種であり、フラボバクテリア綱はバクテロイデス門細菌の中で最も存在量の多いグループである。海洋表層に生息するフラボバクテリアには完全に従属栄養的に生活するものと、光駆動型のプロトンポンプであるプロテオロドプシン (PR) を持ち、従属栄養的なエネルギー獲得に加え光エネルギーを介した ATP 生産を行うものが存在する。ここで、PR は海洋表層細菌の約半数が持つことから海洋表層への適応に重要な遺伝子であると考えられている。

しかし、海洋性フラボバクテリアにおいては表層分離株であっても進化的に PR を欠失させたと考えられる株が存在し、このことは海洋表層環境においても PR を持つことが必ずしも適応的に働かないケースの存在を示唆する。このような背景のもと、本研究では、PR を持つ細菌と PR を持たない細菌の生理生態の違いからそれぞれの適応戦略を明らかにするため、海洋性フラボバクテリア 76 株を用いて PR を持つ株 (PR+ 株、35 株) と PR を持たない株 (PR- 株、41 株) のゲノムを比較した。

比較ゲノムの結果、全ての PR+ 株はフレキシルビン色素の合成系を欠失していることがわかった。フレキシルビンは細胞外膜に局在する色素であり、細胞内への光の透過を妨げると考えられる。また、PR+ 株は PR- 株に比べ多くの UV ダメージ耐性遺伝子を持つ一方で、PR+ 株の多くは光感受性の補因子 (Vitamin B12) 依存の DNA 合成遺伝子を持たなかった。これらの事実から、海洋性フラボバクテリアにおける細胞内膜上の光利用遺伝子 (PR) と外膜上に存在する色素 (フレキシルビン) には以下のようなトレード・オフ関係が存在することが示唆された。

1. 細胞内膜上の PR を機能させるためには外膜上の色素 (フレキシルビン) の欠失が必要
  2. 外膜上の色素を欠失させると細胞内の光ダメージが増加する
  3. 光防御のための遺伝子を多く持つ必要が生じ、また光感受性の補因子の利用に制限が生じる
- 本発表では、このようなトレード・オフ関係から PR を持つフラボバクテリアと PR を持たないフラボバクテリア、それぞれの適応戦略について議論していきたい。

## P-180

**紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* における炭素源飢餓条件下での光合成遺伝子の発現**

○菅野 菜々子, 花田 智, 松浦 克美, 春田 伸

首都大・院生命

E-mail: n\_kanno@tmu.ac.jp

自然環境中での栄養源供給は不安定であり、細菌はしばしば栄養源飢餓を経験する。紅色非硫黄光合成細菌は嫌気条件下で光合成により光エネルギーを利用してATPを合成する。これまでの研究で紅色光合成細菌は炭素源飢餓条件でも、光照射下では数週間生残することを報告しており、紅色光合成細菌にとって光合成機能は環境で生き延びるための重要な手段といえる。本研究では紅色光合成細菌が炭素源飢餓の非増殖条件下で光合成機能をどのように維持しているのかを明らかにすることを目的に、飢餓条件下における光合成遺伝子の発現および光合成器官と光合成能を、光照射の有無に注目して調査した。

紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* を使用した。炭素源制限培地を用いて光嫌気条件下で培養し炭素源枯渇によって増殖停止したところから飢餓とした。飢餓細胞を明条件と暗条件に分け、飢餓5日後に全RNAを抽出し、全ORFを対象にしたマイクロアレイを用いて転写物を解析し、飢餓直後の細胞と比較した。rRNAの発現量に対して1/1000発現量以上の遺伝子数は、飢餓直後および明条件では全遺伝子中32%および27%だったが暗条件では3%のみであり、暗条件のmRNA転写活性は低いことが示唆された。光合成関連遺伝子のうち、光捕集系タンパク質の遺伝子に注目すると、飢餓暗条件でも、飢餓直後や飢餓明条件と変わらず、発現遺伝子の中で高発現していた。培養液の近赤外光吸収スペクトルを測定し光捕集系複合体LH2に特有の吸収ピークの二次微分強度を解析したところ、飢餓5日間経過による顕著な変化は見られなかった。飢餓暗条件の細胞では、生残性は維持しているもののATP量が低下している。しかし1分間光照射すると、飢餓直後や飢餓明条件の細胞と同程度までATPレベルが回復した。

*R. palustris* では炭素源飢餓の非増殖条件下で光照射の有無に関わらず光捕集系タンパク質の遺伝子が高発現しており、暗条件下の細胞も光合成によるATP合成能を保持していた。これは飢餓環境で積極的に光合成器官を維持する戦略をとることを示唆している。光合成関連遺伝子の中でも光捕集系タンパク質の遺伝子が高発現していたことから、今回の解析では光捕集系複合体の吸収スペクトルに大きな違いは見られなかったものの、光捕集系が飢餓適応している可能性も考えられた。



## P-181

### 光受容体を介した *Methylobacterium* 属細菌の光応答の解析

○井口 博之

京都学園大・バイオ環境

【背景】 地球上には太陽から光が普遍的に降り注いでおり、生物にとって光はエネルギー・シグナル・傷害といった多様な意味を持っている。また、昼夜、季節、影の発生に伴う光の量の変動は、周期的および一時的な環境の変化をもたらしている。しかし、これまでの微生物研究において大半の微生物は暗所で培養されており、微生物が光に対してどのような応答を持つのかあまり知られていない。そこで本研究では、微生物の生息場所の中でもとりわけ光を受ける環境と考えられる植物葉上に注目した。細菌の光に対する応答機構と葉上での生理生態を明らかにするため、葉上の主要な微生物である *Methylobacterium* 属細菌の光に応答する表現型を解析した。

【結果】 *M. extorquens* AM1 を暗所と光照射下（青・赤色蛍光灯）とで培養して、各種の表現型を比較解析した。その結果、光照射下では、液体培養での生育速度が上昇し、バイオフィルムの形成量が減少することが分かった。また、ストレスへの耐性能にも変化が認められた。本菌のゲノムには、BLUFやLOVドメインを持つタンパク質、Phytochrome といった色素タンパク質など多様な光受容体がコードされている。次に、見出した光応答性の表現型がどの光受容体の制御系に属するのか明らかにするため、各光受容体の遺伝子破壊株（11株）を作製して表現型を調べた。いくつかの破壊株では、光照射下でのストレス耐性誘導が起きなくなった。さらに、植物葉上での増殖が野生株より低下した破壊株も見つかり、本菌の光応答は植物上での生育に寄与していると考えられた。



## P-182

# 光合成滑走細菌 *Chloroflexus aggregans* の青色光による運動抑制と逃避行動

○福島 俊一, 春田 伸, 花田 智

首都大学東京

E-mail: fukushimash1986@gmail.com

*Chloroflexus aggregans* は通性嫌気性光合成細菌であり、バクテリオクロフィルcを主な光合成色素として、469nm、743nm近傍の光を利用した光合成を行う。数十から数百の細胞が直列に繋がった糸状体を形成し、直進的な高速滑走運動をする。本細菌はアルカリ温泉において観察される高密度な微生物群集（微生物マット）の主要構成種として、広く見つかっている。自然環境下では、昼夜サイクルなどの光条件の変動に対応する必要がある。これまで滑走運動に対する他細菌や酸素の影響は調べられてきたが、光に対する挙動は知られていない。本細菌の光と運動の関係性を明らかにすることは、運動による環境変動への適応戦略の理解に貢献する。本研究では、*C. aggregans*の運動が、種々の光の波長によって受ける影響を明らかにすること目的とした。

糸状体のガラス表面上での動きに光が与える影響を、光学顕微鏡下で観察した。位相差観察用の白色光に加えて、水銀ランプ光源からバンドパスフィルターを通して特定波長域の光を視野全体に照射し、波長ごとの運動速度を比較した。波長395-440nmの青色光を照射したところ、糸状体の運動は照射した光の強さに依存して抑制された。照射を中止した後、運動速度は時間依存的に回復した。一方、波長450-490, 537-557, 625-655nmの照射光では運動速度の抑制は見られなかった。

波長395-440nmの光を視野中央の直径300  $\mu$  m程度の範囲に絞って照射し、その影響を観察した。ここでは、細胞密度を高くして、細胞集団全体の動きに注目した。上述のように青色光照射領域中央の糸状体の運動は抑制されていた。一方照射領域の縁では、数百  $\mu$  mの糸状体が並列に寄り集まり、相互の細胞表面を滑走運動した。時間経過に伴い、照射領域内の細胞は、照射領域外の細胞に引っ張られるように青色光から逃避する方向に移動していく様子が観察された。上述の他の波長域の光に対しては、このような方向性のある細胞集団の運動は観察されなかった。

本研究では、波長395-440nmの青色光が*C. aggregans*の運動性が抑制されることを見出した。青色光による運動速度の抑制は滑走細菌では初めての報告である。微生物マット内では、青色光を受けて運動を抑制することで、青色光の影響を受けない他の糸状体の滑走運動により、手繰り寄せられるようにして青色光を含む短波長の光から逃れられるのではないだろうか。

## P-183

### 光波長制御による微生物マット相互作用の解明

○西田 暁史<sup>1</sup>, 中川 麻悠子<sup>2</sup>, 鮎川 翔太郎<sup>3</sup>, 山村 雅幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東工大・院情, <sup>2</sup>東工大・ELSI, <sup>3</sup>早稲田大・先進理工

E-mail: nisida@es.dis.titech.ac.jp

光合成細菌や化学合成細菌、数百種類から成る微生物マットは、その中で基質や光の奪い合いという競争、有機物の生産者と消費者による搾取、酸化還元サイクルによる協力といった様々な形で細菌が相互作用している。その微生物マットの中で影響力のある働きをしている光合成細菌であるが、異なる光合成細菌間では吸光する波長の違いによって棲み分けしている。中房温泉の50-60℃付近に生成する微生物マットでは表面に可視光を利用する *Cyanobacteria*、その下の層にはより長い波長を利用する *Chloroflexi* などの光合成細菌が利用する光波長によって棲み分けるように存在していることが知られている。自然環境中では前述したように相互作用しながら生態系が形成されているはずであるが、特定の細菌に摂動を与えることは難しく、それらの光合成細菌が他の細菌にどのような影響を及ぼしているかは未知である。本研究では光波長を制御することにより特定の光合成細菌に対してニッチ環境を作り、非光合成細菌の微生物マット内構成比にどのような影響が生じるかを調べた。多様な光合成細菌が生息する中房温泉の温泉中に光照射装置と層状微生物マットを均一化したマットを設置し、様々な光波長（620、720、890nm）を照射することで菌構成がどのように変化したかをメタ 16S rRNA 解析により調べた。その結果、元の層状マットの多様性は保持したまま、特定の光合成細菌に有利な環境を作ることで、いくつかの化学合成細菌の相対量が増減していることを確認した。

## P-184

### 偏性共生細菌ゲノムにおける進化選択圧の解析

○金城 幸宏<sup>1,2</sup>, 本郷 裕一<sup>1</sup>, 徳田 岳<sup>3</sup>, 大熊 盛也<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東工大・院生命理工, <sup>2</sup>理研BRC・JCM, <sup>3</sup>琉大・熱生研

一般に、共生細菌が宿主との関係性を偏性化していく進化過程で、そのゲノム構造に大きな変化が生じる。例えば、ゲノムサイズが極端に小さくなることや塩基組成がATに大きく偏ることなどがその代表である。これについては、共生体が宿主間を伝播する際に生じる集団構造の縮小により遺伝的浮動が促進されたことが主要因であるとの仮説が広く支持されている。実際にこれまで多くの研究では、偏性共生細菌ゲノム内のコード領域における同義置換率と非同義置換率の比 (dN/dS) が他の自由生活性細菌と比較して有意に高いと推定されており、偏性共生細菌ゲノムの進化過程における遺伝的浮動の優占が示唆されている。しかし、これらの結果は dN/dS の推定に内在する多くの方法論的および生物学的な問題点を無視して行われたものであり、再検討する必要がある。本発表ではまず、dN/dS 推定における時間依存性などの諸問題について概説する。それらを踏まえた上で、これまでの偏性共生細菌ゲノム進化の解析において多くの推定バイアスが生じたことを示す。結果、我々の行った推定では、偏性共生細菌と自由生活性細菌との間にはゲノム全体の dN/dS 推定値に有意な差は見られなかった。これらの結果は、これまで主張されてきた偏性共生細菌における遺伝的浮動の優占がゲノム進化を駆動したとする仮説を支持する結果には一般性がなく、共生関係の偏性化に伴う選択圧の変化が上述のような極端なゲノム構造の進化に大きく貢献したことを示唆している。

## P-185

### **Characteristics of the fatty acid composition in the bathyal Calyptogena clam, *C. octanii*: difference in trophic relationship between surface and vent clams**

○Hiroaki Saito

Ishikawa Prefectural University

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

The lipids of the bathyal Calyptogena clam (*Calyptogena okutanii*), which house chemosynthetic symbionts in the gill filaments, assimilate similar unusual n-4 family (n-1/n-4/n-7) long-chain non-methylene interrupted polyunsaturated fatty acids (NMI-PUFA) together with saturated, monounsaturated, and NMI dienoic fatty acids. Similar to the fatty acid composition of lipid of a hadal clam, *Calyptogena phaseoliformis*, more than 20 kinds of n-4 family PUFA in the clam lipids were found. Noticeable levels of odd-chain PUFA 21:3n-4,7,16 in the Calyptogena clam were also observed. The vent clam, which assimilates thiotrophic bacteria, maintain the plasma membrane by the n-4 family NMI-PUFA. Each symbiont changes the host lipid. Differed from high levels of n-3 PUFA in the surface clams (*Macrura chinensis* and *Ruditapes philippinarum*), high levels of n-4 family NMI-PUFA without n-3 and n-6 PUFA in the vent clam lipids indicate the occurrence of unusual membrane lipid systems in the hosts and symbionts. Compared with the fatty acids in the deepest Calyptogena species, *C. phaseoliformis*, at more than 6,000m depth, the Calyptogena clam ranging at about 1,000m depths has the same kinds of n-4 family PUFA in spite of the marked difference of habitat depths. The occurrence of high diversity in the n-4 family NMI-PUFA suggests adaptation to extreme environments using their membrane fluidities and high biosynthetic potential for similar sulfur-oxidizing bacteria. All the Calyptogena clam lipids thereby exhibit their independence of photosynthetic products and a closed food chain, depending only on geothermal energy from hydrothermal and cold-seep vents.

## P-186

アワビ消化管より単離された *Arcobacter* 属細菌のゲノム解析による機能解明

○水谷 雪乃<sup>1</sup>, 福崎 智司<sup>1</sup>, Ilse Cleenwerck<sup>2</sup>, Peter Bossier<sup>2</sup>, Peter Vandamme<sup>2</sup>, 田中 礼士<sup>1</sup>

<sup>1</sup>三重大院生資, <sup>2</sup>ベルギー・ゲント大

E-mail: 515M321@m.mie-u.ac.jp

【目的】これまで Epsilonproteobacteria 綱に属する *Arcobacter* 属細菌はヒトをはじめとする陸生生物の病原細菌として報告されてきたが、海洋性無脊椎動物から単離されている種にはそのような報告は無く、むしろ共生関係が示唆されている。以前に本学会（2013年秋季大会）にて、メガイアワビ消化管内から、非常に多様な *Arcobacter* 属細菌由来の 16S rRNA 遺伝子を確認したと同時に FISH 解析により、多数の細菌細胞が存在している事を報告した。その後これらの細菌群の単離を試みた結果、偶然的に新規 *Arcobacter* 属細菌として MA5 株の単離に成功し、本菌の分類学的検討を日本水産学会（2015年秋季大会）にて報告した。しかし、未だ本菌の生理的機能は不明な点が多く、宿主との関係性も謎のままである。そこで、本菌のフルゲノム解析によって保有遺伝子を解明し、これらの細菌と宿主との関係性を明らかにする。

【方法】MA5 株を大量培養し、遠心分離により集菌後、Marmur 法により DNA を抽出した。シーケンス用ライブラリを作成後、HiSeq 2500 システムを用いて塩基配列を決定し、得られたリードから Edena によるアッセンブル行程を行った。その後、RAST サーバーを用いて、得られたドラフトゲノムの塩基配列のアノテーションを行った。

【結果】アッセンブルの結果、コンティグ数は 91 となり、合計で 3,490,832 リードの塩基配列が得られた。アノテーションの結果、MA5 株は乳酸や酢酸資化に必須な遺伝子を持つことが明らかになった。また TCA 回路に関与する遺伝子は、Succinyl-CoA ligase 遺伝子以外は検出され、rTCA 回路に関与する遺伝子が一部検出された。他にみられた特徴的な遺伝子群としては、自由生活型の Epsilonproteobacteria 綱でみられる硫黄酸化遺伝子群 (*sox*) や、水素酸化遺伝子群 (*hya*) を保有していた。さらにゲノム情報が公開されている *Arcobacter* 属細菌の中でも、MA5 株は脱窒に関する遺伝子の数が多く、複雑な経路を有する事が示唆された。また今回検出されなかった遺伝子は、コンティグ間での欠落が示唆されるため、今後は PCR などを用いて再度検出し直すと共に、培養法などを用いてこれらの酵素の発現を確認していき、宿主との関係性を明らかにしていく予定である。



## P-187

**深海底熱水活動域に生息する固有甲殻類の共生器官“腹部剛毛”の構造的特徴**○藤吉 奏<sup>1</sup>, 和辻 智郎<sup>2</sup>, 澤山 茂樹<sup>1</sup>, 中川 聡<sup>1,2</sup><sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>JAMSTEC

E-mail: fujiyoshi.so.62w@st.kyoto-u.ac.jp

暗黒・高水圧の深海底熱水活動域に生息するほぼすべての無脊椎動物は、化学合成細菌と共生関係を構築することで栄養を獲得している。深海の固有甲殻類であるゴエモンコシオリエビは、腹部剛毛に細菌を付着させ、それらを摂餌し生活している。共生器官である剛毛にのみ付着共生細菌が密集することから、剛毛の構造に付着共生を促す機構があると予想された。そこで、本研究ではゴエモンコシオリエビと非共生性甲殻類における剛毛の構造的な違いを見出し、またその構造的差異がもたらす物性を特徴づけることにより、異種生物間相互作用機構の解明を目指した。沖縄の伊平屋北熱水活動域で行われた調査航海においてゴエモンコシオリエビを捕集、船上で甲長サイズに依り 3 グループに分類し、腹部剛毛を採集した。2 種類の非共生性甲殻類としてモクズガニ（非共生性だが鋏足に豊かな剛毛を有する）および、オオコシオリエビ（ゴエモンコシオリエビに比較的近縁な種）の腹部剛毛（モクズガニは鋏足剛毛を含む）を採集した。各剛毛を顕微鏡で観察し、その太さと剛毛から生える針状構造（スパイク）の長さを測定した。各剛毛の構造を元に、剛毛周りの水の動きのシミュレーションを行った。また各剛毛に対する微粒子の付着性を調べるため、各剛毛と微粒子を混合し、顕微鏡下で剛毛に付着している微粒子数と剛毛の長さを測定した。微粒子数を剛毛の長さで除算し、各剛毛の微粒子付着率を算出した。ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛の太さは甲長サイズに依って有意に異なり（ $p < 0.01$ ）、大きいほど太かった。しかしスパイクの長さは、甲長サイズに依らず一定の長さであった。また、ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛のスパイク長は他の甲殻類剛毛のスパイクよりも有意に短く、一番長かったモクズガニ腹部剛毛スパイク長の 15 分の 1 程度であった。スパイクの長さや剛毛周りの流体シミュレーションの結果、スパイクが長いほど剛毛近辺の水の動きは停滞することから、スパイクが短いほど毛と水中の分子または微粒子が接触する頻度が高いことが示唆された。各剛毛と微粒子を混合したところ、ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛は他の甲殻類剛毛よりも有意に微粒子付着率が高かった。つまり、ゴエモンコシオリエビにおいて腹部剛毛のスパイクが短いことは、剛毛と周囲の微生物の付着頻度の上昇や物質交換の効率化に寄与することが示唆された。

## P-188

### ゴエモンコシオリエビの外部共生菌相を用いた環境影響評価方法の構築

○和辻 智郎, 元木 香織, 羽田 枝美, 長井 裕季子, 高木 善弘, 豊福 高志, 山本 啓之, 高井 研  
海洋研

E-mail: watsuji@jamstec.go.jp

沖縄の深海熱水噴出域ではゴエモンコシオリエビやヒバリガイを優先種とする独自の生態系が形成されている。ゴエモンコシオリエビの腹側剛毛には細菌（外部共生菌）が付着しており、*Sulfurovum*に分類される独立栄養性硫黄酸化細菌と *Methylococcaceae*に分類されるメタン酸化細菌を多く含んでいる。そして、ゴエモンコシオリエビはそれらの外部共生菌を食べることで、栄養を得るというユニークな生態を持つことを明らかにしてきた。一方で、沖縄の深海熱水噴出域の熱水鉱床は金、銀、銅などの鉱物含有量が高く、埋蔵量も豊富であることから、世界初の海底鉱物資源開発プロジェクトとして2017年には採鉱に関わるパイロット試験が開始される。採鉱では周辺環境を擾乱するなどの生態系への影響が懸念されるため、生態系保護の観点から掘削の影響による環境変化を鋭敏に検出する方法の構築が求められている。そこで、本研究ではメタンを唯一のエネルギー源とする水槽でゴエモンコシオリエビを飼育し、外部共生菌相と環境の関係性を明らかにすることで、外部共生菌相を用いた環境影響評価方法を構築することを目的とした。飼育実験の結果、外部共生菌相の *Sulfurovum* と *Methylococcaceae* を指標とすることで、環境中の硫化水素とメタンの存在をそれぞれ判定できることが強く示唆された。また、メタン添加水槽でゴエモンコシオリエビを飼育すると一次生産者のメタン酸化細菌が供給する有機物が起点となり、従属栄養性細菌が外部共生菌相の多くを占めることが示された。つまり、化学合成細菌で占められる現場の外部共生菌相において従属栄養性細菌が優占化することは、深海熱水域の一次生産者である化学合成細菌が作り出した有機物が拡散しにくい閉鎖的な環境に変化したことを示唆する。そのため、ゴエモンコシオリエビを宿主とする外部共生菌の菌相解析は掘削後の熱水成分の長期的なモニターや地形の変化による海水の拡散性の評価に利用できると考えられた。

## P-189

浅海性無脊椎動物のマイクロバイーム：  
特異 *Helicobacter* の発見と飼育実験

○齊藤 ひかり<sup>1</sup>, 砂田 高志<sup>2</sup>, 多米 晃裕<sup>3,4</sup>, 澤山 茂樹<sup>1</sup>, 澤辺 智雄<sup>2</sup>, 中川 聡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>北大院・水, <sup>3</sup>JAMSTEC, <sup>4</sup>株式会社マリン・ワーク・ジャパン

E-mail: saito.hikari.37x@st.kyoto-u.ac.jp

【目的】 Epsilonproteobacteria 綱の微生物は、深海底熱水活動域において多様な無脊椎動物と共生関係を結ぶ一方で、陸上においては、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) や *Campylobacter jejuni* に代表されるような、人類に蔓延する疾患の原因微生物でもある。これまで我々の研究グループは、深海の共生微生物である Epsilonproteobacteria が、陸上の病原性微生物である Epsilonproteobacteria の祖先的な性質を有することを突き止めてきたが、その進化の過程には大きなミッシングリンクが存在した。そこで本研究では、浅海域で採取した無脊椎動物の消化管や体腔液等に含まれる微生物群集構造を解析した。【方法】 培養可能な微生物の密度・多様性を解析するため、数種類の寒天培地を用いて、微好気条件下かつ複数の温度で培養を行った。形成されたコロニーを純化後、分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行った。さらに、試料から直接 DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った。加えて、これらの結果に基づき、特徴的な微生物について定量 PCR や FISH 法、電子顕微鏡観察、宿主の飼育実験によって、それらの存在量・局在性・形態等を解析した。【結果】 群集構造解析の結果、特定の地域において採取したヒトデ類の体腔液にのみ、特異的で新規性の高い *Helicobacter* 属細菌（既知種との 16S rRNA 遺伝子の相同性が ~93.4%）が優占して生息していることが明らかとなった。*Helicobacter* 属の細菌は陸上に住む脊椎動物の消化管に生息する病原菌・常在菌として知られている。しかし今回発見されたこの細菌は、海洋性で無脊椎動物を宿主とし、消化管以外に生息する世界初の *Helicobacter* である。さらに電子顕微鏡観察により、本 *Helicobacter* と思われる微生物細胞に特徴的な構造物を見出した。加えて、定量 PCR や FISH 法による解析の結果、ヒトデ体腔液における本 *Helicobacter* 属細菌の優占度は、海域によって大きく変動することが明らかとなった。現在、本 *Helicobacter* 属細菌の性状や機能をさらに詳しく解析している。

## P-190

### 海水性白点虫を対象とした簡易検出法の開発

○高崎 一人<sup>1</sup>, 松平 崇弘<sup>1</sup>, 布藤 聡<sup>1</sup>, 伊東 隆臣<sup>2</sup>, 宮川 訓<sup>2</sup>, 伊藤 このみ<sup>3</sup>, 宮側 賀美<sup>3</sup>, 西田 清徳<sup>3</sup>, 工樂 樹洋<sup>4</sup>

<sup>1</sup>(株)ファスマック, <sup>2</sup>NIFREL, <sup>3</sup>大阪・海遊館, <sup>4</sup>神戸理研

E-mail: ktakasaki@fasmac.co.jp

【目的】海水性白点病はナンヨウハギ (*Paracanthurus hepatus*) やクマノミ (*Amphiprion ocellaris*) をはじめとした多くの観賞魚で問題となる代表的な魚病のひとつである。白点病はしばしば水槽のような閉鎖的な環境において発生するため、ひとたび白点を確認されると同じ水槽内の他の魚に連鎖的に感染が拡大する。そのため、水槽内の海水の入れ替えや数週間にも及ぶ薬剤治療(硫酸銅など)等の対策を行わなければならない。以上より、白点病の早期発見・対策が非常に重要であるが、現在までに現場レベルで検出可能な簡易検出キットは存在していない。そこで我々は海水性の白点病を引き起こす白点虫 (*Cryptocaryon irritans*) を迅速・簡便に検出可能な新しい手法の開発に取り組んだ。

【方法】はじめに、白点病が起きている水槽底に付着しているシストを採取し、18S rRNA 遺伝子配列のシーケンス解析を行った。次に、白点病が発生した水槽の海水を 1L 採取し、Miya らの方法に従い、環境 DNA を採取した。採取した DNA は Duret らの方法に従い、18S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象としたアンプリコン解析を行った。さらに、18S rRNA 遺伝子の特定領域を検出マーカーとして利用し、DNA クロマトによる白点虫検出系の構築を行った。

【結果・考察】採取したシストより DNA の 18S rRNA 遺伝子配列を決定し、白点の原因微生物が従来知られている白点虫 (*Cryptocaryon irritans*) であると推測された。18S rRNA 遺伝子の部分配列を利用したアンプリコン解析では、白点病が発生している水槽内の海水には白点虫由来の DNA が含まれていることが明らかとなった。さらに 18S rRNA 遺伝子のうち、白点虫に特異的な配列をマーカーとすることで、DNA クロマトにより白点虫を迅速・簡便に検出することが可能であった。現在、様々な水槽由来の海水を採取し、本手法による白点病検出の検討を進めている。

(参考文献)

Miya *et al.*: *R Soc Open Sci* 2(7):150088, 2015

Duret *et al.*: *FEMS Microbiol Ecol* 91(5) fiv037, 2015

## P-191

### Uncovering rare candidate bacterial phylum TG2 in the termite gut

○Yuniar D. Utami<sup>1</sup>, Hirokazu Kuwahara<sup>1</sup>, Kaito Sugaya<sup>1</sup>, Masahiro Yuki<sup>2</sup>, Moriya Ohkuma<sup>2,3</sup>, Yuichi Hongoh<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech., <sup>2</sup>RIKEN-BMEP, <sup>3</sup>RIKEN-JCM

Termite gut microbiota contains a large amount of yet-uncultivated bacteria, including members of rare candidate phyla. In this study, we present the elusive and rare candidate phylum TG2 (Termite Group 2 or ZB3); we elucidated its phylogenetic diversity and localization. We performed amplicon sequencing of the 16S rRNA gene from the gut microbiota of diverse termite taxa and consistently found TG2 bacteria in most of the samples in low abundances. We inspected the gut microbiota of three different termite species and FISH analyses disclosed that certain members of these TG2 bacteria were specifically located on the surface of protist cells in the gut. We further found that these TG2 members are associated only with a specific group of gut protists, suggesting species-specific symbiotic interaction.



## P-192

### シロアリ腸内原生生物の細胞表面に共生する *Treponema* 属細菌 3 種の シングルセルゲノム解析

○雪 真弘<sup>1</sup>, 桑原 宏和<sup>2</sup>, 本郷 裕一<sup>2,3</sup>, 大熊 盛也<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>理研 CSRS, <sup>2</sup>東工大・院生命理工, <sup>3</sup>理研 BRC・JCM

E-mail: masahiro.yuki@riken.jp

シロアリの腸内には、数種から十数種の原生生物と数百種以上の細菌が共生している。さらに、これらの原生生物の細胞内、細胞表面にも数種の細菌が共生しており、複雑な微生物叢となっている。共生原生生物の 1 種である *Pyrsonympha* sp. の細胞表面には、3 種の *Treponema* 属細菌 (Cluster I, Cluster IIA, Cluster IIB) が共生していることが報告されている。しかし、それぞれの細菌の機能に関しては分かっておらず、なぜ宿主表面上に同属細菌 3 種が共生しているのかは不明であった。本研究では、各細菌の役割を明らかにするため、シングルセルゲノム解析技術を駆使し、3 種の *Treponema* 属細菌のゲノム配列の決定を試みた。マイクロマニピュレーションで宿主である *Pyrsonympha* sp. を 20 細胞集め、破碎することにより、*Treponema* 属細菌を含んだ溶液を調製した。この溶液から、セルソーターを用いて細菌細胞をシングルセルに分離後、Phi29 DNA polymerase により全ゲノム増幅を行い、複数の 3 種の *Treponema* 属細菌の全ゲノム増幅産物を取得した。この全ゲノム増幅産物を用いて MiSeq 及び PacBio により、ゲノム配列データの取得を行った。これまでに、ゲノム完全性が、Cluster I のもので 69%、Cluster IIA で 75%、Cluster IIB で 40% のドラフトゲノム配列が得られた。現在、これらのドラフトゲノム配列を用いてアノテーションを行っている。本大会では、シロアリ共生系での重要な機能である窒素固定、還元的酢酸生成やリグノセルロース分解等について、各細菌の役割分担を議論する。

## P-193

### 長期に隔離された共生微生物群集では群集レベルの競争が生じるか？

○北出 理<sup>1</sup>, 佐藤 渚<sup>1</sup>, 野田 悟子<sup>2</sup>, 飯田 敏也<sup>3</sup>, 大熊 盛也<sup>3</sup>

<sup>1</sup>茨城大・理, <sup>2</sup>山梨大・生命環境, <sup>3</sup>理研・BRC・JCM

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

異なる生物群集が融合した際の群集の動態には未解明な点が多い。Gilpin (1994) は、競争を経て安定になった 2 つの群集を融合させると、融合後の群集の種組成が片方の親群集の組成に収束しやすくなる事をシミュレーションで示し、「群集レベルの競争」が生じる可能性を提示した。長期に隔離された群集でこの傾向は強まると思われるが、自然群集を用いた検証は行われてこなかった。シロアリの腸内には原生生物や細菌からなる微生物群集が存在し、構成種は代謝を介し強く相互作用する。私達がヤマトシロアリとカンモンシロアリの 2 種を交雑させ、シロアリ種に特異的な原生生物群集を混合させた実験では、交雑コロニーの原生生物群集は、1 コロニーを除きヤマト型の種組成に収束した。ただし形態に基づく同定だけでは、2 種のシロアリが共有する原生生物種の継承パターンは不明であった。

本研究では、2 種のシロアリの野外コロニーと 2 つの交雑コロニーの個体の腸内から DNA を抽出し、共生微生物の SSU rRNA 遺伝子の部分配列を標的に、パイロシーケンスによる網羅的配列解析を行った。野外コロニーから検出された原生生物の配列には、シロアリの種に特異的なものが含まれた。交雑コロニーの個体からは、ヤマトに特異的な原生生物属の配列は検出されたが、カンモン特異的な原生生物属の配列はほぼ検出されなかった。親種が共有する原生生物の種については、ヤマト特異的な配列は全て交雑コロニーに継承されたが、*Teranympa* 属を除きカンモン特異的な配列は引き継がれなかった。以上の結果から、交雑コロニーの原生生物は、共通種を含めほぼヤマトのものに収束したといえる。一方、細菌を対象とした解析では、原生生物細胞に共生する細菌を除き、明らかに偏った継承パターンは見いだされなかった。

原生生物群集では、構成種間の共適応が群集構成種の強固な結びつきをもたらし、ほぼ群集レベルの競争といえる継承パターンを引き起こしたと考えられる。また、別種のシロアリ集団が野外で交雑した場合、交雑後のコロニーでは共生原生生物群集の種組成は必ずしも一通りにならないが、世代を経ると集団は急速に特定の組成に収束すると予測される。

## P-194

セン毛虫 *Tetrahymena thermophila* の細胞外分泌物が細菌の群集構造に及ぼす影響

○多羅尾 光徳, 濱部 淳

東京農工大学・院農

E-mail: tarao@cc.tuat.ac.jp

細菌の捕食者である原生動物が細胞外に分泌する物質 (protozan extracellular exudates, PECE) によって生残性や生育が促進される細菌が存在すると仮説を立てて研究を行った。モデル原生動物として無菌株が得られているセン毛虫 *Tetrahymena thermophila* を用いた。2つの培養槽を孔径  $0.1 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで隔てた二槽式培養器を作成した。一方の培養槽で *T. thermophila* と淡水由来の細菌群集を混合培養し (BT区, PECEあり・捕食あり), 他方の培養槽には細菌群集のみを培養した (B/BT区, PECEあり・捕食なし)。対照として細菌群集のみの培養系 (B区, PECEなし・捕食なし) を設定した。暗所  $25^\circ\text{C}$  にて好氣的に培養しながら適宜, 細菌DNAを抽出し, PCR法にて増幅したSSU rRNA遺伝子をDGGE法にて分離し, 得られたバンドパターンに基づき細菌群集構造を解析した。また, 各培養区の細菌密度を経時的に測定した。その結果, BT区においては群集構造が培養の経過にしたがい大きく変化し, 培養10日目には培養開始時とは大きく異なる構造となった。いっぽう, B/BT区においては群集構造が大きく変動することがなく, 培養10日目においても培養開始時とほぼ類似した構造を維持した。またB区においては培養6日目まではB/BT区と類似した群集構造であったが, 10日目には大きく異なる構造となった。細菌密度は全ての培養区において初期密度の  $5 \times 10^6 \text{mL}^{-1}$  から, 培養4日目までには約  $1 \times 10^7$  まで上昇した。それに伴い, BT区においては *T. thermophila* の細胞密度が上昇した。その後, 細菌密度は培養期間の経過に伴い低下し, 培養10日目には  $6 \times 10^6$  まで低下した。いっぽう, B/BT区およびB区においては培養10日目にはそれぞれ  $8 \times 10^6$  および  $5 \times 10^6$  に低下した。以上の結果から, BT区において細菌群集構造が大きく変化した理由は, 細菌密度の増加に伴い *T. thermophila* が細菌種を選択的に捕食したためと考えられる。B区において群集構造が変化した理由は, いったん増加した細菌が死滅するとき, 種ごとに生残性が異なるためであったと考えられる。いっぽう, B/BT区においては, BT区やB区と比較して細菌密度の低下の程度が低く, 細菌群集構造が比較的安定的に維持された理由は, PECEが細菌の増殖・生残を促進したためと考えられる。本研究より, PECEが細菌群集構造に影響を及ぼす可能性のあることが示された。

## P-195

### シロアリ腸内原生生物の細胞表面に共生する新規 *Endomicrobium* 属細菌

○伊澤 和輝<sup>1</sup>, 名倉 有一<sup>1</sup>, Nathan Lo<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>3</sup>, 本郷 裕一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>東工大 院生命理工, <sup>2</sup>School of Biological Science University of Sydney, <sup>3</sup>理研 BRC JCM

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

シロアリの腸内には多様な原生生物と原核生物が共生しており、これらの微生物が効率的な木質分解に寄与している。腸内原核生物には、腸内自由生活型の他、腸内原生生物の細胞表面・細胞内の共生体が存在する。

本研究で着目する *Endomicrobium* 属細菌は、主に腸内原生生物の細胞内共生体として存在する腸内優占種群の一つである。先行研究により、他の腸内優占種群である *Bacteroidales* 目、*Treponema* 属の細菌については、腸内自由生活型や、腸内原生生物の細胞表面・細胞内の共生体が報告されている。しかしながら、これまで *Endomicrobium* 属細菌については、腸内原生生物の細胞表面共生体の報告がなかった。

本研究では、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより細胞表面共生 *Endomicrobium* 属細菌を探索した。その結果、複数のシロアリ腸内原生生物種の細胞表面に共生する新規 *Endomicrobium* 属細菌を複数種発見した。この内の一種について透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、腸内自由生活型の *Endomicrobium* 属細菌と形態が類似しており、特異な構造物により原生生物細胞表面に付着していた。16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統解析の結果、今回発見した細胞表面共生体の *Endomicrobium* 属細菌は多系統であることが示唆された。加えて、腸内自由生活型細菌の配列と単系統を成すものが存在したことから、これら細胞表面共生体は複数の系統の腸内自由生活型から独立に派生したものとみられる。



## P-196

## シングルセルトランスクリプトームに基づくイエシロアリ共生原生生物の機能解明

○西村 祐貴<sup>1</sup>, 小田切 正人<sup>2</sup>, 雪 真弘<sup>2</sup>, 守屋 繁春<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>理化学研究所 バイオリソースセンター, <sup>2</sup>理化学研究所 環境資源科学研究センター

E-mail: yuki.nishimura@riken.jp

シロアリの腸内では多種多様な細菌・古細菌・原生生物が混在する多重共生系が存在していることが古くから知られており、木質という非常に分解困難かつ栄養が偏った物質のみ取り込みながら、熱帯地域で莫大なバイオマス誇る宿主(シロアリ)の繁栄に大きく貢献している。シロアリが食害した木質は主に原生生物が分解し、宿主への炭素供給源となっている。さらに腸内に共生している細菌が窒素固定を行うことで、木質からは取り込むことのできない窒素源を補っている。しかしながら、なぜ多様な微生物から共生系が構成されているかについては未だに十分な説明ができていない。そこで個々の微生物種がどのような役割を担っているかを明らかにすることが望まれるが、腸内微生物のほとんどが培養不可能であることが詳細な機能解析を阻んでいる。

イエシロアリ腸内には3種の真核微生物(*Pseudotrichonympha grassii*, *Holomastigotoides mirabile*, *Spirotrichonympha leidyi*)が生息している。本研究では各々の種が共生系で果たす役割を明らかにするために、それぞれの単一細胞からトランスクリプトームデータを取得した。得られたデータから遺伝子配列とその発現量を推定し、3種間で発現遺伝子にどのような違いがあるのかを検討した。その結果、*S. leidyi*においてのみ多量のキチン分解酵素(キチナーゼ)の遺伝子が発現していることが判明した。また、*S. leidyi*でのみキチン分解産物であるN-アセチルグルコサミンをアンモニアとフルクトース6リン酸にまで分解する遺伝子を有していることが示された。そこでイエシロアリの後腸から真核微生物3種が混在する画分と、*H. mirabile*及び*S. leidyi*の2種のみが存在する画分に分離した。その後それぞれの画分からタンパク質を粗精製し、2種から抽出したタンパク質の方が有意にキチナーゼ活性が高いことを確認した。すなわちイエシロアリ腸内に共生する3種の微生物のうち、*S. leidyi*が主体的にキチンの分解に関わっていることを示している。このことから*S. leidyi*は宿主が脱皮した後に摂食した体表や、グルーミング等によって取り込まれた菌類を分解することで、効率的な窒素源の利用や菌糸感染からの防衛に貢献していると考えられる。



## P-197

# シロアリ腸内原生生物に共生する *Desulfovibrio* 属細菌のゲノム解析による 3 者間共生システムの解明

○桑原 宏和<sup>1</sup>, 雪 真弘<sup>2</sup>, 伊澤 和輝<sup>1</sup>, 大熊 盛也<sup>2,3</sup>, 本郷 裕一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>東工大・生命理工学院, <sup>2</sup>理研・BMEP, <sup>3</sup>理研・JCM

シロアリは植物枯死体のみを餌とし、腸内にセルロース分解性原生生物、真正細菌および古細菌を共生させている。その原生生物の中には、細胞内、表面、さらには核内に複数の真正細菌が共生するものがあり、多重な共生関係が存在する。しかしながら、培養成功例が無いため共生機構の詳細は不明であった。ヤマトシロアリ腸内原生生物 *Trichonympha agilis* は普遍的に 2 種類の真正細菌を共生させ、1 つは細胞質内に共生する "*Candidatus Endomicrobium trichonymphae*" でゲノムが解読されている。もう 1 つは *T. agilis* の鞭毛基部近傍のヒドロゲノソームが多く見られる部位に局在し、ほぼ細胞内共生であるが一部が開口している "*Candidatus Desulfovibrio trichonymphae*" である。本研究では "*Ca. Desulfovibrio trichonymphae*" をマイクロメスで分取し、全ゲノム増幅後、Illumina MiSeq によるシーケンス、およびゲノム解析を行った。その結果、1.4 Mb の完全長ゲノム配列の再構築に成功した。"*Ca. Desulfovibrio trichonymphae*" は、多くの偽遺伝子があり、近縁の *Desulfovibrio desulfuricans* (2.8 Mb) と比べ小さなゲノムを持っていた。一方、多くのアミノ酸、補酵素合成系遺伝子を保持し、それらは同時共生細菌と一部相補的になっていた。興味深いことに、それら共生細菌祖先間でアミノ酸トランスポーター (AroP) の遺伝子水平伝播が起こったことが明らかとなった。さらに、"*Ca. Desulfovibrio trichonymphae*" は、水素を硫酸還元またはフマル酸呼吸により酸化する複雑な代謝系も保持し、宿主および同時共生細菌から発生する水素を消費して宿主のセルロース分解を促進していると考えられる。また、"*Ca. Desulfovibrio trichonymphae*" は、宿主と同時共生細菌が生成する酢酸、二酸化炭素を炭素源とし、さらには、宿主が合成するリンゴ酸を取り込み、フマル酸呼吸を行うというように、3 者間で効率的に代謝産物を利用していると考えられる。本研究により、シロアリ腸内原生生物における複雑な共生システムの一端が明らかとなった。

## P-198

## マルチオミクス解析でサンゴと微生物の相互作用を推定する

○丸山 徹<sup>1</sup>, 伊藤 通浩<sup>2</sup>, 若王子 智史<sup>1</sup>, 新里 宙也<sup>3</sup>, 藤村 弘行<sup>4</sup>, 中野 義勝<sup>2</sup>, 須田 彰一郎<sup>4</sup>, 竹山 春子<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>早大院・先進理工, <sup>2</sup>琉大・熱生研, <sup>3</sup>OIST・マリングenomix, <sup>4</sup>琉大・理, <sup>5</sup>早大・ナノライフ

E-mail: marui-25@fuji.waseda.jp

【背景】サンゴは褐虫藻、共生細菌叢と共同体を作り、密接に関係している。褐虫藻はサンゴの細胞内に共生する微細藻類であり、光合成によってサンゴが要求する炭素源の大部分を産生する。褐虫藻との共生関係は脆く、温度上昇などのストレスが加わると褐虫藻は細胞内から失われる。この共生関係の崩壊は、世界的に減少を続けるサンゴの主要な死因の一つとされている。また、サンゴの共生細菌叢に関しても、その菌叢組成の異常がサンゴの健康状態に影響することが報告されている。以上の事例から、褐虫藻・共生細菌叢を含む共同体レベルでサンゴの生理・生態を理解することが重要であると考えられる。しかしながら、温度変化に応じて褐虫藻との共生関係が崩壊する機構や、細菌叢がサンゴに影響を与える機構など、その詳細には謎が多い。

【方法】本研究では、この共同体で行われる相互作用の理解に向けて、サンゴ・褐虫藻・共生細菌叢のマルチオミクス解析を実施した。2014年11月から2016年3月の間に計7回、沖縄県瀬底島周辺の3地点からウスエダミドリイシ (*Acropora tenuis*) 7群体を採取し (1) サンゴ・褐虫藻の mRNA の同時 RNA-seq と (2) サンゴ共生細菌叢の 16S rRNA アンプリコンシーケンスを実施した。

【結果・考察】 (1) サンゴ・褐虫藻の遺伝子発現プロファイル、共生細菌叢の組成はそれぞれ独立した変動パターンを示した。サンゴの発現プロファイルは群体ごとに、褐虫藻の発現プロファイルは季節ごとに、細菌叢の組成は地点・群体ごとに変動することが判明した。 (2) 一方で、一部の遺伝子群に関してはサンゴと褐虫藻の間で強く共発現することが見出された。これらの遺伝子群の解析から、褐虫藻の細胞分裂が宿主細胞内で抑制される分子機構など、サンゴと褐虫藻の幾つかの相互作用を推定することができた。 (3) 海水温度の上昇に伴って発現が亢進するサンゴの遺伝子群を見出した。他のサンゴ種の RNA-seq データを同様に解析した結果、この遺伝子群は他のサンゴ種でも高温条件下で発現上昇することが確認された。また、この遺伝子群には、褐虫藻と共生する刺胞動物 (サンゴ・イソギンチャク) に進化的に保存されている機能未知の遺伝子も多数含まれていた。以上の点から、サンゴの高温ストレス応答に関わる機能未知の遺伝子群が抽出された可能性が示唆された。

## P-199

## シロアリ腸内原生生物細胞表面共生細菌の microdiversity 解析にもとづく伝播様式についての考察

○猪飼 桂<sup>1</sup>, 望月 悠司<sup>1</sup>, 雪 真弘<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>2,3</sup>, 本郷 裕一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>東工大・生命理工, <sup>2</sup>理研・CSRS, <sup>3</sup>理研・BRC-JCM

E-mail: kigai@bio.titech.ac.jp

下等シロアリ腸内には多様な原生生物（鞭毛虫）が生息し、特徴的なことに、原生生物の細胞内と細胞表面に共生細菌が存在する。細胞表面共生細菌が木質分解や窒素固定など腸内共生系で重要な役割を担うことが明らかになっている一方で、その伝播様式や、原生生物の分裂時に同調して分裂するのか、原生生物に絶対共生しているのか、などについては未知な部分が多い。細胞内共生細菌の場合、ゲノム配列から予測される機能と、宿主1細胞内でのそれらの16S rRNA 遺伝子およびITS配列がほぼ100%相同であることから、自由生活相を持たない絶対共生体で、垂直的にのみ次代に伝わると考えられている。本研究では、ヤマトシロアリ腸内で優占的な、原生生物細胞表面共生細菌 '*Candidatus Symbiothrix dinenymphae*' のITS配列に基づくmicrodiversity解析を行い、細胞表面共生細菌の伝播様式の手がかりを得ることを目指した。

'*Ca. Symbiothrix dinenymphae*' は、*Dinenympha*属原生生物の少なくとも3種の細胞表面に、鞭毛のように数本から数十本、付着共生している。*Dinenympha*各種を1細胞ずつ分取し、全ゲノム増幅後、校正機能付きDNA polymeraseを用いたPCRにより'*Ca. Symbiothrix dinenymphae*' の16S rRNA 遺伝子とITSを含む約2,300 bpを増幅し、クローン配列解析を行った。同時に、*Dinenympha*の18S rRNA配列を決定し、宿主の種類を確認した。

*Dinenympha* 1細胞サンプルのうち、1つで共生細菌ITS配列は100%相同であったが、他7サンプルでは多様なITS配列が取得され、1サンプル内のITS相同性は85–99%であった。大きな欠損や挿入もみられた。これらのITS配列の系統解析を行ったところ、'*Ca. Symbiothrix dinenymphae*' には明確な宿主種特異性は認められなかった。これらの結果から、細胞表面共生細菌 '*Ca. Symbiothrix dinenymphae*' は、細胞内共生細菌のように垂直的にのみ伝播されるのではなく、宿主*Dinenympha*種間での水平的な伝播も生じることが示唆された。

## P-200

## 氷河に特化した無脊椎動物の共生細菌群集構造解析

○村上 匠<sup>1</sup>, 瀬川 高弘<sup>2,3,4</sup>, 竹内 望<sup>5</sup>, Roman Dial<sup>6</sup>, Pedro Labarca<sup>7</sup>, Gonzalo B. Sepulveda<sup>8</sup>, 幸島 司郎<sup>9</sup>, 本郷 裕一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東工大 院生命理工, <sup>2</sup>山梨大 総合分析実験センター, <sup>3</sup>極地研, <sup>4</sup>新領域融合センター, <sup>5</sup>千葉大 院理,

<sup>6</sup>Alaska Pacific Univ., Alaska, USA, <sup>7</sup>Centro de Estudios Científicos, Chile, <sup>8</sup>Dirección General de Aguas, Chile,

<sup>9</sup>京大 野生動物研究センター

E-mail: tmurakami@bio.titech.ac.jp

氷河は年間を通じて雪氷に覆われた低温極限環境であるが、環境に適応した無脊椎動物・藻類・細菌などからなる独特な生態系が存在する。こうした氷河に生息する生物、特に藻類や細菌といった微生物の生態や多様性に関する研究が進む一方で、氷河環境に特化した大型無脊椎動物に関する情報は未だ限定的である。我々は、動物に共生する細菌群集が宿主動物の生存や、生息環境の物質循環に寄与するという知見に着目し、氷河無脊椎動物の腸内や体表に共生する細菌叢の群集構造解析を行った。実験には、アラスカの氷河に生息するコオリミミズと南米パタゴニアの氷河に生息する氷河カワゲラを用いた。比較対象として生息氷河表面の細菌叢も同時に解析した。DNA と RNA 試料の双方から 16S rRNA 配列を PCR 増幅した後に MiSeq を用いて網羅的に配列を取得した。解析の結果、コオリミミズ・氷河カワゲラともに、生息氷河表面と大きく異なる細菌群集を保持していることが判明した。共生細菌群集の構成種は、動物腸内特異的な細菌系統と氷河由来の細菌系統の 2 群に大別された。RNA 試料を基にした解析により、これら 2 群の双方が細菌群集内で活動的であると示唆された。また、コオリミミズにおいて、一部の氷河由来細菌種は氷河表面ではなくコオリミミズからより顕著に検出された。これらコオリミミズに特徴的な氷河由来細菌種の内、*Arcicella* 属の細菌種がコオリミミズ表皮に局在していることを FISH による種特異的な検出により明らかにした。以上の結果から、氷河無脊椎動物は動物腸内特異的な細菌種を、氷河環境への適応進化の過程でも保持し続けている一方で、氷河由来の細菌種とも共生関係を構築していると推察された。そして、これら無脊椎動物の細菌群集の共生系は氷河生態系において特異なニッチを占めていると示唆された。これらの情報は、氷河無脊椎動物の氷河適応過程や、氷河生態系における役割を解明する上で基盤になると考えられる。現在、共生細菌群集の持つ代謝機能の解明のため、氷河カワゲラの腸内細菌叢を対象としたメタゲノム解析を行なっている。この成果についても触れる予定である。



## P-201

### シロアリ腸内原生生物のメタン菌細胞内共生による同所的種分化の可能性

○酒井 海帆<sup>1</sup>, 間瀬 貴子<sup>1</sup>, 猪飼 桂<sup>1</sup>, 木原 久美子<sup>2</sup>, Nathan Lo<sup>3</sup>, 大熊 盛也<sup>4</sup>, 本郷 裕一<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>東工大・院生命理工, <sup>2</sup>熊本高専・生物化学システム工学, <sup>3</sup>シドニー大, <sup>4</sup>理研・BRC-JCM

シロアリ腸内には1～10種類以上の木質分解性原生生物が常に同時共生している。なぜ、これら複数種の原生生物が互いに競争排除されずに共存し続けているのかは不明である。オーストラリアにのみ生息するムカシシロアリの腸内には*Mixotricha paradoxa*という巨大な原生生物が共生している。*Mixotricha*は1種のみからなる属として古くから知られ、特に細胞表面に付着するスピロヘータによる運動共生で有名である。我々は、この*M. paradoxa*の一部の細胞にメタン生成古細菌が細胞内共生しているのを発見した。しかも、メタン生成古細菌が共生している細胞としていない細胞では、形態に明確な違いが見られた。そこで、*Mixotricha*を1細胞ずつ分取して全ゲノム増幅後、PCRによって18S rRNA遺伝子を増幅して解析を行ったところ、共生メタン菌の有無によって同遺伝子配列に2%以下の相違があり、系統的に分岐していることがわかった。また16S rRNA遺伝子配列に基づく分子系統解析によると、共生メタン菌は、シロアリ腸内を含む多様な環境に見られる*Methanobrevibacter arboriphilus*と99%の配列相同性を示した。これは、比較的最近に細胞内共生系が進化したことを示唆している。つまり、*Mixotricha*の一部の系統がメタン菌と共生したことでニッチの分化が生じ、同所的種分化を引き起こしつつある可能性がある。



## P-202

## 環境から獲得される細胞内共生細菌：ナガカメムシ類で見つかった腸内共生から細胞内共生へのミッシングリンク

○竹下 和貴<sup>1</sup>, 松浦 優<sup>2</sup>, 孟 憲英<sup>1</sup>, 三谷 恭雄<sup>1</sup>, 菊池 義智<sup>1,3</sup><sup>1</sup>産総研・生物プロセス, <sup>2</sup>琉球大・熱生研, <sup>3</sup>北大・院農

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

多くの昆虫が体内の共生微生物と緊密な相互作用を行っているが、そのような共生関係の分子基盤やその進化プロセスに関してはいまだ不明な点が多い。特に昆虫における「細胞内共生」の進化は昆虫共生の理解において大いなる謎とも言える。多くの細胞内共生細菌が系統的に腸内細菌科に属することから細胞内共生の起原は腸内共生（細胞外共生）にあると考えられているが、その進化プロセスについては現在に至るまでほとんど分かっていない。最近我々は、斑点米カメムシの一種として知られる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）において、腸内共生から細胞内共生への遷移段階にあると考えられる興味深い共生系を発見したので報告する。

昆虫における多くの細胞内共生系は共生微生物の母子間伝播を伴い、宿主昆虫の系統において連綿と受け継がれていることが知られている。一方、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が共生細菌の母子間伝播を行わず、代わりに毎世代環境中から共生細菌（*Burkholderia* spp.）を獲得し、消化管後端部に位置する袋状組織（盲囊）の内腔に保持する。ホソヘリカメムシ（ヘリカメムシ上科・ホソヘリカメムシ科）における先行研究では、*Burkholderia* 腸内共生細菌は生存に必須ではないものの、体サイズの増加、成長期間の短縮、産卵数の増加に大きく寄与し、高い適応度効果を持つことが明らかとなっている。本研究においてコバネヒョウタンナガカメムシの調査を行ったところ、他のカメムシ類と同様に *Burkholderia* 共生細菌を毎世代環境中より獲得し盲囊に保持することが確認された。しかし、共生細菌の適応度効果を調査したところ、非感染個体は成虫になることなく全て死亡し、必須共生であることが示された。さらに、詳細な電子顕微鏡観察を行ったところ、共生細菌は盲囊の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が明らかとなった。昆虫において必須共生細菌を環境中から毎世代獲得し細胞内に保持する例はこれまで報告がなく、コバネヒョウタンナガカメムシは初めての例となる。今回発見した共生系は、腸内共生から細胞内共生への進化をつなぐミッシングリンクともいえ、これまでアプローチ困難だった細胞内共生の進化原理をひも解くための大きな足がかりになるかもしれない。

## P-203

***Burkholderia*のヒミツの姿～ *Burkholderia*細胞壁合成不全変異株はホソヘリカメムシ共生時に異常な細胞形態を示す**○後藤 菜<sup>1</sup>, 竹下 和貴<sup>2</sup>, 大林 翼<sup>1</sup>, 松浦 優<sup>3</sup>, 菊池 義智<sup>1,2</sup><sup>1</sup>北大・院農, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>琉球大・熱生研

E-mail: s-510@chem.agr.hokudai.ac.jp

細菌との内部共生は動植物に広く見られる普遍的な現象で、共生細菌は宿主生物の栄養代謝に重要な役割を果たしている。共生細菌にとって宿主体内は栄養豊富な安定した環境である一方、宿主免疫系などのストレスも存在し、共生細菌には様々な変化が引き起こされる。例えば、根粒菌は共生に伴いバクテロイドと呼ばれる窒素固定に特化した多核の巨大細胞に変化するが、どのような機構でこのような形態変化が起きるのかはほとんど分かっていない。

大豆の重要害虫として知られるホソヘリカメムシは、消化管後端部に袋状の組織(盲嚢、もうのう)を多数発達させ、その内腔中に*Burkholderia*属の共生細菌を保持している。*Burkholderia*はβ-プロテオバクテリア綱に属する土壌細菌で、ホソヘリカメムシは幼虫期に土壌中からこの共生細菌を特異的に獲得することが知られる。この共生細菌は培養および遺伝子組換えが容易であり、またホソヘリカメムシはRNAiが容易であることから、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia*共生系は内部共生現象の分子基盤を解くための有用なモデル系だと考えられている。カメムシ盲嚢内において、共生細菌は小型化し細胞表面構造(特にLPS構造)が大きく変化することが報告されている。そこで本研究では細菌の表面構造、特に細胞壁に着目し、それら細胞壁成分がホソヘリカメムシ-*Burkholderia*共生系の成立と維持に果たす役割について調査した。

先行研究において我々は、ペプチドグリカン加水分解酵素であるN-acetylmuramyl-L-alanine amidase (AmiC)を欠損した共生細菌変異株( $\Delta$  *amiC*株)が試験管培養時に連鎖状になることを発見した。この $\Delta$  *amiC*株がカメムシ体内でどのような挙動を示すのか明らかにするため、定量PCRにより感染後の共生細菌動態を調査すると共に、盲嚢内における共生細菌の細胞形態変化を観察した。野生株、 $\Delta$  *amiC*株の緑色蛍光タンパク質(GFP)発現変異株を作成し、カメムシに経口接種後、2～5齢幼虫それぞれにおける細菌量を調査し、細胞形態を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、 $\Delta$  *amiC*株の共生細菌量は野生株と大きな差は見られなかった一方、共生細菌の細胞形態は劇的に変化しており、 $\Delta$  *amiC*株では膨大化した巨大細胞(swollen cells)が各齢を通して多数観察された。

これらの結果より、細胞壁の恒常性は宿主への感染能には影響しないものの、カメムシ盲嚢内における細胞形態変化に大きく影響することが明らかとなった。

## P-204

# メタゲノムのアプローチによる生理活性物質を生産する海綿共生微生物の探索

田中 志貴子<sup>1,2</sup>, ○新里 尚也<sup>1</sup>, 齋藤 星耕<sup>1</sup>, 青山 洋昭<sup>3</sup>, 白井 由実<sup>1</sup>, 朴 相和<sup>1</sup>, 伊藤 道浩<sup>1</sup>, 田中 淳一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>琉球大・熱生研, <sup>2</sup>琉球大・院理工, <sup>3</sup>琉球大・戦略セ

### 【背景】

海棲生物である海綿からは様々な生理活性物質が単離されているが、これらは海綿に付随する微生物（共生微生物）により生産されていると考えられている。こうした生理活性物質の生産を担う微生物の特定と生合成経路の解明は、海綿の共生微生物の多くが難培養性である等の理由により、その詳細は明らかとなっていない。本研究では、沖縄近海で採取される、同一化合物を含有する異種海綿について、網羅的な共生微生物相の解析を行い、生理活性物質の生産と共生微生物の関係を探ることを目的とした。

### 【材料・方法】

本研究では、アクチンの重合阻害活性を示す化合物、latrunculin を共通に含有する2種の実、*Cacospongia mycofijiensis* ならびに、*Negombata* sp. を研究対象とした。沖縄近海で採取した海綿の各3個体よりDNAを抽出し、バクテリアの16S rRNA 遺伝子のV1-V3領域をPCR増幅した。次いで、それらをRoche 454 GS Jr. を用いて網羅的シーケンス解析をおこない、それぞれの海綿サンプルにおける共生微生物相を解析した。

### 【結果・考察】

GS Jr. によるシーケンス解析の結果、全体として約165,000リードの配列が得られた。この内、有効なデータを97%の配列相同性を閾値としてクラスタリングをおこなった結果、試料あたり156～273のOTU (Operational Taxonomic Unit) が得られた。次いで、得られたOTUをBLASTを用いてデータベース上の配列と照合し、各OTUの系統学的位置の推定をおこなった。その結果、*Actinobacteria*、*Cyanobacteria*、*Proteobacteria* が比較的高い割合で検出された。また、各サンプルにおいて最も優占している上位10 OTU (計40 OTUs) をサンプル間で比較したところ、同一海綿種内での組成は極めて似通っているものの、海綿種間の組成は大きく異なっており、共通するOTUはほとんど見られなかった。しかしながら、*Proteobacteria* や *Actinobacteria* において、同一OTUでは無いものの、系統学的に近接したOTUが複数、共通に見出されていたことから、これらの中にlatrunculinを生産している系統群が含まれている可能性も考えられた。これらの点については、現在、詳細な検証を進めている。

## P-205

## カブトムシ幼虫腸管内細菌叢と代謝産物

○和田 典子<sup>1</sup>, 岩淵 範之<sup>2</sup>, 砂入 道夫<sup>2</sup>, 岩田 隆太郎<sup>3</sup>, 中嶋 睦安<sup>2</sup>, 安齋 寛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>日大・生資科・くらしの生物, <sup>2</sup>日大・生資科・応生科, <sup>3</sup>日大・生資科・森資科

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

【目的】森林生態系の中で、温帯の落葉広葉樹林に生息し、消費者および分解者として大きな地位を占めている森林性昆虫は、植物由来の各種多糖の分解に大きな役割をしていると考えられている。特にカブトムシの幼虫は、雑木林に生息し、植物遺体などを摂食する腐食性の昆虫として有名であり、分解者として、森林の物質循環で重要な役割を持つ昆虫である。本研究グループでの先行研究により、前腸、中腸、後腸に分かれているカブトムシ幼虫の腸管は、pHがアルカリ性であり、幼虫が摂食する腐植したクヌギやコナラなど含まれる $\beta$ -1, 3-グルカン、 $\beta$ -1, 4-キシラン、ペクチン等の可溶性多糖に対する強い分解活性が、特に中腸においてその傾向が顕著に示され、カブトムシ幼虫腸管における糖質分解活性の分布が明らかになった。しかしながら、腸管内に存在する糖質の代謝経路や腸管内細菌の役割についてはまだ明らかになっていない。そこで本発表では、カブトムシ幼虫の腸内環境と細菌叢および酵素で分解された糖が最終代謝産物としてどのようなようになるのかを解明する目的で各種実験を行った。【方法】腸内環境について、揮発性脂肪酸・水素・メタンの検出はGCで行った。また、溶存酸素濃度は専用のプローブを使用した。腸管内細菌叢については、幼虫を10分割にし、さらに腸管内容物と腸管壁に分離してからTotal DNAを抽出後、PCR-DGGEを行い、さらに得られたバンドの部位別変化を主成分分析を用い検討した。【結果と考察】腸管内の溶存酸素濃度を測定したところ、中腸・後腸共に低酸素状態であり、特に後腸内は著しく嫌氣的であった。そこで、腸内容物から発生するガスを捕集し分析した結果、中腸で水素が、後腸でメタンが検出された。揮発性脂肪酸については、どの部位でも酢酸が多く検出された。酢酸濃度を部位別に見ると、飼料である腐葉土と比較しても、中腸前半で増加し、後半で減少、後腸ではさらにそれが低下していたことから、中腸において、酵素分解によって存在する可溶性糖質から発酵により酢酸が生産され、その後、後腸で消化吸収されている可能性が考えられた。腸管内細菌叢については、PCR-DGGEとバンドの主成分分析の結果から、中腸と後腸、腸管内容物と腸管壁でそのプロファイルと比較すると、細菌叢の明確な部位別の変化が検出され、腸内環境と発酵産物の組成から腸内の分解経路を推定した。



## P-206

**Burkholderia 細菌の昆虫腸内への適応機構の解明**

○大林 翼<sup>1</sup>, Peter Mergaert<sup>2</sup>, 二橋 亮<sup>3</sup>, 寺島 美亜<sup>4</sup>, 孟 憲英<sup>3</sup>, 三谷 恭雄<sup>3</sup>, 曾根 輝雄<sup>1</sup>, 菊池 義智<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>北大・農, <sup>2</sup>フランス・CNRS, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>北大・低温研

E-mail: tsubasa-oobayashi@aist.go.jp

多くの動植物は周囲の環境中から特定の共生細菌を獲得しているが、宿主体内には病原菌を排除するために多くのストレスが存在することが知られている。それら共生細菌が宿主に感染・定着するためには宿主のストレス環境に適応しなければならず、その結果として細菌の形態や代謝生理が劇的に変化することが知られている。ホソヘリカメムシはダイズの重要害虫で、幼虫時に土壤中から *Burkholderia* 属の細菌を特異的に獲得することが知られている。*Burkholderia* 細菌はカメムシ中腸の後端部に発達する盲のうと呼ばれる無数の袋状組織の内腔中に定着している。これまでの研究で、*Burkholderia* 細菌はカメムシ腸内共生時に細胞膜の LPS 構造を変化させることやポリエステルを細胞内に蓄積することが分かっているが、これまでに得られた知見はいずれも特定の機能に着目した断片的なものばかりであった。そこで今回、我々は *Burkholderia* 細菌の昆虫腸内への適応機構を徹底的に理解するため、試験管培養時と昆虫腸内共生時の 2 種類の細菌を用意し、RNA-seq 解析や顕微鏡観察などを行い、代謝制御系や細胞形態に関する変化を網羅的に調べた。その結果、腸内共生時の *Burkholderia* 細菌では複数の代謝制御経路が亢進していた一方、走化性やべん毛運動性に関する制御系は抑制されていることが明らかになった。亢進していた代謝経路の中には、アラントイン分解経路、抗菌ペプチド耐性機構、および細胞分裂関連遺伝子などが含まれた。カメムシの盲のう部では多数の抗菌ペプチドが発現していることやアラントインは昆虫の主要な窒素老廃物であることから、共生細菌が腸内環境に存在するストレスに適応すると同時に宿主の老廃物をうまく利用して生育していることが示唆された。次に、顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより、共生時における *Burkholderia* 細菌はその細胞形態が桿菌から球菌に変化し、1 細胞当たりの DNA 量が減少していることが確認された。さらに、腸内環境を想定した酸化ストレス、界面活性剤ストレス、細胞毒性ストレスに対する耐性能を調査したところ、腸内共生時の細菌は培養時のものと比べてこれらのストレスに対する感受性が増加していることが明らかになった。本発表では、得られた代謝変化と形態生理変化の結果を統合し、どのようにして *Burkholderia* 細菌が昆虫腸内に適応し生育しているのかについて総合的に議論する。



## P-207

# Investigation of gut microbiota of green dock beetles of the genus *Gastrophysa*

○ Wakako Ikeda-Ohtsubo<sup>1</sup>, Hiroshi Mori<sup>2</sup>, Atsuko Miyagi<sup>3</sup>, Noriyuki Ojima<sup>4</sup>,  
Michael Kwan Fu Lee<sup>1</sup>, Aram Mikaelyan<sup>5</sup>, Ken Kurokawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Agr. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Cent. Info. Biol., Nat. Inst. Gen. (NIG), <sup>3</sup>Dep. Env. Sci. & Tech., Saitama Univ.,

<sup>4</sup>Tohoku Gakuin Junior High & High Sch., <sup>5</sup>Dep. Biol. Sci. & Path., Vanderbilt Univ.

E-mail: wakako.ohtsubo@tohoku.ac.jp

The green dock beetles of the genus *Gastrophysa* preferentially feed on broad-leaved dock *Rumex obtusifolius*, a relatively common weed plant and an invasive species originating from Europe, which causes ecological and economical problems in many countries. Oxalate, which is generally toxic to animals, is present at a high concentration in the leaves of *R. obtusifolius* but accumulates in the bodies of *Gastrophysa atrocyanea* only when treated with antibiotics. This suggests gut microbiota of *G. atrocyanea* may play a significant role in oxalate degradation and thereby enables *Gastrophysa* beetles to live on *R. obtusifolius*. To understand the gut microbiota in detail, we constructed and analyzed metagenomic 16S rRNA gene libraries of gut microbiota in *G. atrocyanea* and *Gastrophysa viridula* collected in multiple sites in Japan and Germany, respectively. The family *Enterobacteriaceae* dominated the gut microbiota of both *Gastrophysa* species, and phylotypes affiliated with the species *Rahnella*, *Serratia*, and *Pantoea* formed largest populations. Interestingly, 16S rRNA gene sequence of the phylotype of *Rahnella* was almost identical to that of a novel strain isolated from *G. atrocyanea* using semi-synthetic medium supplemented with oxalate. A gene homolog of oxalate decarboxylase, which sequence was assigned to *Enterobacteriaceae*, was found in the metagenomic library of *G. viridula*, which suggests that oxalate is converted to formate in the gut of the beetles.

## P-208

***Clostridium perfringens*はメンブランベシクルを介して宿主免疫応答を誘導する**

○永山 恭子<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 中尾 龍馬<sup>2,3</sup>, 泉福 英信<sup>3</sup>, 中村 幸治<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大・院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系, <sup>3</sup>国立感染研・細菌第一

多くの微生物はメンブランベシクル (MV) を生産し、外部環境に放出することが知られている。MVの大きさは一般的に 20-500 nm であり、核酸やタンパク質、毒素などを含有することから様々な物質の輸送体として機能していることが明らかとなってきた。MVはグラム陰性菌でその生産が多く報告されている一方、外膜の存在しないグラム陽性菌における報告は少なく、その詳細な機能や形成メカニズムはほとんど明らかにされていない。グラム陽性偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトを含む動物の腸管内に常在し、多くの毒素や細胞外酵素を生産することから食中毒やガス壊疽の原因菌として知られる一方で、腸内細菌悪玉菌の一つとしても知られている。ウェルシュ菌MVが宿主に与える影響を解析するために、マウスマクロファージ様細胞J774.1に添加したところ、IL-6やTNF- $\alpha$ といった各種炎症性サイトカインの放出を誘導することが明らかとなった。MV添加により、マクロファージ様細胞においてグラム陽性菌の細胞壁成分の受容体として知られるToll-like receptor 2 (TLR2) の発現が上昇し、TLR2阻害剤によってMV添加時におけるIL-6放出量が減少することが明らかとなった。このことから、ウェルシュ菌MVはTLR2を介して宿主細胞からの各種炎症性サイトカイン放出を誘導することが示唆された。また、ウェルシュ菌Membrane画分をマクロファージ様細胞に添加したところ、MV添加時と比較してTNF- $\alpha$ の放出は同程度に誘導した一方で、IL-6放出量やTLR2発現量が減少したことから、ウェルシュ菌MVはMembrane画分とは異なる炎症性サイトカイン誘導性を示すことも明らかとなった。さらに、ウェルシュ菌MVをマウス鼻腔に接種したところ、血中にはウェルシュ菌特異的IgG抗体、全身の粘膜面(鼻腔、口腔、腸管)にはIgA抗体が生産誘導されることが明らかとなった。以上のことから、ウェルシュ菌MVは宿主の自然免疫および獲得免疫を誘導することが明らかとなった。本研究により、腸内細菌ウェルシュ菌の放出するMVは宿主免疫に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

## P-209

### ヒト腸管ムチンに存在する硫酸還元細菌の探索

○秋葉 練介, 大坪 和香子, 北澤 春樹, 齋藤 忠夫

東北大・院農

E-mail: rennsuke9684@gmail.com

ヒト腸管には硫酸還元細菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) が常在し、潰瘍性大腸炎等の腸疾患への関与が指摘されているが、SRBのヒト腸管内における生態・生理はほとんど明らかにされていない。本研究では、腸疾患患者由来のヒト腸管ムチンに存在するSRBの培養、単離および培養非依存的検出を試みた。有機酸（酢酸、クエン酸、乳酸）および硫酸塩を含む半合成培地 (van der Hoeven et al., 1995) を調製し、腸疾患患者由来の腸ムチン試料を添加後、嫌気条件下、37℃において七日間集積培養を行った。FeSの黒色沈殿が見られた培養液の一部からDNAを抽出し、SRBの機能遺伝子である異化的亜硫酸還元酵素 $\alpha$ サブユニット遺伝子 (*dsrA*) に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行ったところ、予測されるサイズ (~ 1,900 bp) のバンドが確認された。また、同様に16S rRNA遺伝子のPCR増幅およびクローン解析を行ったところ、未培養系統型の*Desulfovibrio*属 (Proteobacteria門) および*Desulfotomaculum*属 (Firmicutes門) の配列が確認できたが、優勢クローン (~ 67 %) は*Eubacterium*属であった。一方、複数の腸疾患患者由来の腸ムチンから抽出したDNAを鋳型として行った16S rRNA遺伝子のT-RFLP解析およびクローン解析では、SRBは検出されず、*Bacteroides*属や*Parvimonas*属が優勢化していた。本研究において、SRBの検出が困難な腸管ムチンからSRBを集積培養できたことから、継続的な培養条件の検討により、新規系統型のヒト腸管由来SRBの単離を目指したい。

## P-210

# MiSeqを用いたヒト毛髪に付着する細菌群集構造解析

○渡邊 康太<sup>1</sup>, 西 英二<sup>2</sup>, 田代 幸寛<sup>1</sup>, 酒井 謙二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大院・生資環, <sup>2</sup>大分県・科搜研

E-mail: kobutin52@gmail.com

### 【背景・目的】

ヒトの皮膚, 腸内などには多様で個人に固有の細菌群集構造が存在することが知られている. 我々は先行研究により, ヒト毛髪にも固有の細菌群集構造が存在し, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を用いることで, 個人を識別できる可能性を報告している. (西ら, 日本微生物生態学会第30回大会, 2015) しかしながら, T-RFLP法では細菌群集構造の系統分類情報を得ることはできないことから, 本研究ではヒト毛髪に付着する細菌群集構造をMiSeqを用い, 詳細に解析することを目的とした.

### 【実験方法】

被験者2名(日本人男性)から毛髪の提供を受けた. 次に, 毛根を含めない毛幹部を用いた毛髪サンプルより細菌DNAを抽出し, qPCRにて毛髪1 cm当たりのコピー数を測定した. その後, PCR法にて16S rRNA遺伝子のV4領域を増幅し, MiSeq (Illumina社)にてシーケンスを行った. 得られたデータをUSEARCH, QIIMEを用いてOTU (97%)レベルでの解析を行った. 検討項目として, 被験者間, 保存の影響, 頭部の部位間(前髪, 頭頂部, 後髪, 右側頭部, 左側頭部), 1本中の部位間(先端部, 中間部, 後端部), 洗浄の影響(milli Q, 界面活性剤), 色の有無(白髪, 黒髪)について検討した. 各項目につき毛髪を3本ずつ採取し, 解析した.

### 【結果・考察】

qPCRの結果, 毛髪1 cmあたり平均 $10^4$  copiesの細菌が存在することが示された. 次に, MiSeqによる細菌群集構造の解析の結果, 被験者間で $\alpha$ 多様性と $\beta$ 多様性の両方で有意差が確認された. 共通する優占属として*Pseudomonas*属が検出され被験者間で*Propionibacterium*属と*Dietzia*属の占有率に違いが見られた. また, 採取後1ヶ月常温保存した毛髪ではコピー数に差はなかったが,  $\alpha$ 多様性が保存後では減少し値はバラつき,  $\beta$ 多様性においても有意差が確認された. よって, 常温保存期間中に, 細菌群集構造は不安定で変化することが示唆された. 今後被験者を増やし男女間, 年齢の違いによっても異なるかどうか解析する予定である.

## P-211

**桧原湖北部に存在する大腸菌の *lacZ* 部分塩基配列に基づいた由来の推定**○野田 真優子<sup>1</sup>, 奥田 圭<sup>2</sup>, 難波 謙二<sup>3</sup><sup>1</sup>福島大・院理工, <sup>2</sup>福島大・環境放射能研究所, <sup>3</sup>福島大・理工

E-mail: s1010143noda@gmail.com

【目的】本研究では桧原湖北部に存在する大腸菌の由来の推定を行うことを目的とし、桧原湖北部と温血動物の腸管に存在する大腸菌の *lacZ* 部分塩基配列の遺伝子解析を行った。福島県耶麻郡北塩原村に位置する桧原湖は、糞便汚染の指標菌である大腸菌群数が環境基準値（1000 MPN/100 ml）を超過している湖の一つである。大腸菌群は自然環境中に普遍的に存在するものも含まれており必ずしも糞便汚染を反映しているものではないが、桧原湖湖内ではより信頼性の高い糞便汚染の指標菌である大腸菌も検出されていることから糞便汚染が懸念される。しかし、桧原湖北部周辺地域の下水道加入率は8割を超えており一概に集落が原因であるとは考えにくい。大腸菌の表現型や遺伝子型により、大腸菌の宿主を推定する方法がいくつか報告されているが、その中でも標的遺伝子の塩基配列を比較する方法を用いて由来の推定を試みた。

【方法】桧原湖北部湖内とその流入河川、解剖から得たイノシシ、ハクビシン、タヌキの直腸内容物、桧原湖北部流入河川周辺に落ちていたキツネ、テン、クマの糞から分離した大腸菌を対象に遺伝子解析を行った。菌の分離はBGLB発酵管法を用いて大腸菌群の計数を行った後の最高希釈段階の陽性管からと、Colilert<sup>®</sup>で大腸菌陽性となったウェルから行った。菌の同定にはAPI20Eを用いた。遺伝子解析はPCR法を用いて *lacZ* の264 bpの部分配列を増幅し、精製したのちに塩基配列を決定した。末端付近の不明瞭な配列を除き240 bpについて塩基配列の比較を行い、配列の種類ごとに名前を付けグループ分けを行った。

【結果】データバンクから得たヒト由来大腸菌の塩基配列も含め144株から30グループが得られた。桧原湖北部の東側から分離された多くの菌株がA1グループであり、西側とは異なる傾向を示した。東側に存在したA1, A3, A4グループは複数の哺乳類から得られたグループであった。ヒトから分離されているA2グループは桧原湖北部の西側に存在した。

【結論】桧原湖北部の西側と東側で異なる流入源から大腸菌が流入していることが明らかとなった。また、桧原湖北部の西側の河川は集落の影響を受けている可能性がある。東側から分離された大腸菌の流入源を明らかにするには、さらに大腸菌を識別するため解析を行う部位を増やす必要があると考えられる。



**P-212****Mouse gut microbiota composition is altered by elemental diet and pancrelipase treatment**

○ Hiroki Nishiyama<sup>1</sup>, Susumu Goto<sup>1</sup>, Tomoyuki Nagai<sup>2</sup>, Yoshihisa Okazaki<sup>2</sup>, Shunya Sakurai<sup>2</sup>, Hiroyuki Ogata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Chemical Life Center, BIC, ICR, Kyoto Univ., <sup>2</sup>Kindai Hospital

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

Ulcerative Colitis (UC) is an inflammatory bowel disease (IBD) which causes pain, bloody diarrhea, and in severe cases, cancer. There are neither fundamental remedy nor knowledge on its pathogenesis. However, past studies on UC has shown that the composition of gut microbiota is related with the disease. Furthermore, a clinical study has observed amelioration of symptoms in UC patients treated with elemental diet (Elental), an enteral nutritional supplement. Another research has observed amelioration of symptoms and change of gut microbiota composition in Elental treated model mice of Crohn's disease, another IBD with symptoms similar to UC. From these studies, we hypothesized that the availability of nutrition affects the composition of gut microbiota, which in turn affects the state of UC. Our interest is to examine this hypothesis through examining the gut microbiota of colitis model mice treated individually with Elental and Pancrelipase (Lipacreon), a drug containing digestive enzymes. Here we will present results from our preliminary research in which we examined PCR amplicons of 16S rRNA encoding genes derived from five separate parts of the gut taken from non-treated, Elental-treated, and Lipacreon-treated groups of healthy mice fed with normal diet. Sequencing of 16S rDNA amplicons were conducted by using Illumina MiSeq. The paired-ends reads were first quality trimmed and merged. Then the reads were clustered into operational taxonomy units (OTUs). Next taxonomies were assigned to each OTUs by aligning their representative sequences against Greengenes Database. After obtaining taxonomic compositions of each samples, we analyzed their  $\alpha$  diversity. To evaluate the change of microbiota composition, we also used statistical methods to identify individual bacterial taxa whose frequencies significantly differ between treatments. These analyses revealed differences in terms of  $\beta$  diversity and individual bacterial taxa between control and treated samples.

## P-213

### 非マメ科植物への根粒形成能付与の試み

○三輪 大樹, Kun Yuan, 岡崎 伸

農工大・院農

E-mail: hmiwa@cc.tuat.ac.jp

マメ科植物は根粒菌と共生して窒素固定を行う根粒を形成する。この共生窒素固定はマメ科植物に限られており、イネや小麦などの穀物は根粒菌との共生能を持たない。また一般に根粒窒素固定はエンドファイトによる窒素固定に比べて窒素固定効率が高いと考えられている。そのため共生窒素固定を非マメ科植物にも付与することができれば、大幅に窒素肥料を減らすことが可能となる。先行研究により、オーキシシン活性を持つ2,4-DやNAAを処理するとイネの根に不定根が形成されることが知られている。これはpara-noduleとも呼ばれ、イネにおける根粒になりうるのではないかと研究されてきた。本研究では、オーキシシン情報伝達系に着目し、イネのpara-nodule形成について解析を行った。イネ品種として日本晴を用いてNAA処理を行った結果、1 mg/Lでpara-noduleの形成が見られた。また接種菌として*Bradyrhizobium elkanii* USDA61を用いて、NAA処理を行ったところ、根粒菌の植物地際部の細胞間隙への感染が見られた。しかし、para-noduleへの根粒菌の感染は見られなかった。またオーキシシンを外的投与した場合には、冠根の数が増えると同時に、根の伸長阻害が見られた。今後、イネに根粒形成能を付与するためには、根の伸長阻害を避けつつ部分的にオーキシシン情報伝達系を活性化し、para-noduleを誘導することが必要であると考えられる。そのため、オーキシシン情報伝達に関与する冠根形態形成遺伝子に着目し、これらを人工エフェクターとして根粒菌に導入することで根粒形成を誘導できるか検証していく予定である。

## P-214

### Rhizobial genes involved in the symbiosis with host legumes

○ Hien P. Nguyen<sup>1</sup>, Omar M. Faruque<sup>1</sup>, Hiroki Miwa<sup>1</sup>, Takakazu Kaneko<sup>2</sup>, Shusei Sato<sup>3</sup>, Shin Okazaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology,

<sup>2</sup>Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, <sup>3</sup>Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

E-mail: [nguyenphuochien92@gmail.com](mailto:nguyenphuochien92@gmail.com)

Symbiosis specificity has been demonstrated in the interactions between rhizobia and leguminous plants. While the compatible symbiosis leads to formation of the nitrogen-fixing nodules, some cultivars exhibit incompatibility with the specific strains, resulting in ineffective nodulation. *Vigna radiata* cv. KPS1 and soybeans carrying *Rj4* gene are incapable of nodulation with *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 due to presence of pathogen-like proteins. This work was performed to understand the molecular mechanisms underlying nodulation incompatibility of KPS1 and *Rj4* plants. By mutagenesis, we isolated six Tn5 mutants of USDA61, designated BE5, BE21, BE53, BE85, BE103 and BE168, which could nodulate KPS1 efficiently. The T3SS mutant BErhcJ could form nodules on both KPS1 and *Rj4* soybean. Similarly, inoculation test on *Rj4* soybean revealed that four mutants BE5, BE85, BE103 and BE168 were able to nodulate, suggesting the commonality of incompatible mechanism of KPS1 and *Rj4* plants. Sequencing analysis of the Tn5-flanking sequence indicated that five genes encoding the cytosine deaminase, hypothetical proteins, manitol-binding protein and GTP pyrophosphokinase respectively were disrupted. The deduced gene products of these Tn5 mutants shared high similarity with the hypothetical proteins of pathogens. One *tts* box was found at 96-bp in upstream of *bel53* gene found in BE53, indicating that the gene product was involved in T3SS. To determine the infectious properties of USDA61 and its mutant, the infection process of BE21 was analysed using *DsRed* and *gusA* genes. Both USDA61 and BE21 infected KPS1 through infection threads (ITs) and formed bumps. Our results indicated that KPS1 halted both infection and nodule organogenesis of *B. elkanii* USDA61.

## P-215

## 水稲種子に共生する窒素固定細菌の動態と窒素固定能に関する研究

○蓑田 尚人<sup>1</sup>, 池永 誠<sup>2</sup>, 川内 智裕<sup>3</sup>, 小野 祥子<sup>1</sup>, 境 雅夫<sup>2</sup><sup>1</sup>鹿児島大・農, <sup>2</sup>鹿児島大・学術研究院農, <sup>3</sup>鹿児島大院・連合農

植物の種子に共生する細菌は、植物の生育にとって重要な役割を持つと考えられており、種子を介した次世代への継代が指摘されている。このため、微生物資材として有用な細菌を探索する上で、種子や幼苗は有効なホットスポットと考えられる。我々のグループは、これまで籾殻を取り除き表面殺菌した水稲種子を無菌的に幼苗まで栽培し、水稲種子に共生する細菌の群集構造と動態について解析してきた。その結果、植物個体が異なっても同じ部位には類似する群集構造が形成され、個体の違いよりも部位の違いで群集構造が異なる事、さらに移行先の葉や根では、窒素固定細菌の存在比が増加する事を明らかにしてきた。しかしながら、種子及び幼苗の葉と根における窒素固定活性の有無、窒素固定細菌の細菌数の変化については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、窒素固定活性及び窒素固定細菌の細菌数に着目し、その関連性について検討を試みた。実験方法：水稲種子の籾殻を取り除き、種子表面の洗浄・殺菌を行った。MS液体培地とバーミキュライトを支持物として加えたプラントボックスに種子を植え付け、人工気象器内で無菌的に幼苗まで約3週間栽培した。幼苗の葉と根を採取し、同じ部位を数個体混ぜ合わせて磨砕した懸濁液と、個体毎に各部位を磨砕した懸濁液を調整した。籾殻を取り除き表面殺菌した種子の懸濁液も同様に調整した。数個体混ぜ合わせて調整した各部位の懸濁液を、SMM-N軟寒天培地が入った試験管に接種・培養し、2週間後にARAを測定した。一方、個体別に調整した各部位の懸濁液は、段階希釈後、希釈液をSMM-N寒天培地に塗抹・培養した。2週間後にコロニーカウントを行い、個体間及び部位間でコロニー数を比較した。結果考察：種子及び幼苗の葉・根試料のARAを測定した結果、種子ではARAは検出されなかったものの、葉と根で強いARAが検出された。他方、コロニー数の差異に着目すると、植物個体が違って部位が同じの場合、コロニー数は同程度で、個体の違いよりもむしろ部位の違いでコロニー数は大きく異なり、葉は種子に比べて数百倍程度、根は数千倍程度多かった。以上の結果より、葉と根の窒素固定細菌は元々種子由来であるが、種子ではその数も少なくARAも検出限界以下であった事、また、幼苗の生育過程で葉と根に移行・増加し、窒素固定を通して幼苗生育に関与していたのではないかと推測された。

**P-216**

## **Genetic Diversity and Symbiotic Phenotype of Hairy Vetch Rhizobia in Japan**

○元 坤, HIROK MIWA, MAKI IIZUKA, TADASHI YOKOYAMA, YOSHIHARU FUJII, SHIN OKAZAKI

東京農工大学・連合農学

E-mail: yuankun555@hotmail.com

Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) is a leguminous crop widely used as green manure and a cover crop in Japan. It exhibits strong weed-suppressing activity, high resistance to insect pests, and the ability to fix nitrogen through symbiotic interactions with soil bacteria known as rhizobia. Few studies have investigated the rhizobia that form nodules on hairy vetch in Japan, and the biological resources available for selecting high nitrogen-fixing rhizobia are limited. In the present study, we isolated 110 hairy vetch rhizobia from 13 different areas in Japan. Based on their 16S rRNA gene sequences, 73% of the isolates were identified as *Rhizobium leguminosarum*. A comparative analysis of *nodC* and 16S rRNA gene phylogenies revealed that several isolates possessed congruent *nodC* sequences despite having divergent 16S rRNA gene sequences, suggesting that the horizontal transfer of *nod* genes occurred during the evolution of rhizobia. Inoculation tests showed that isolates closely related to *R. leguminosarum* had better plant growth-promoting effects than other strains, thereby providing a promising agricultural resource for inoculating crops. Key words: hairy vetch (*Vicia villosa* Vicia villosa), Rhizobia, nodulation



## P-217

### 放線菌 *Frankia* の細胞表層多糖の変化が窒素固定と共生に及ぼす影響

○九町 健一<sup>1</sup>, 白石 隼大<sup>1</sup>, 小川 誠也<sup>1</sup>, 堅持 智博<sup>1</sup>, 飛鳥井 滉也<sup>2</sup>, 金城 伶<sup>2</sup>, Philippe Normand<sup>3</sup>, 橋本 雅仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大・院理工, <sup>2</sup>鹿児島大・理, <sup>3</sup>University Lyon 1

E-mail: kkucho@sci.kagoshima-u.ac.jp

*Frankia*は窒素固定を行う多細胞放線菌である。ハンノキやグミに代表される 8 科 200 種以上の樹木の根（根粒）に共生することもでき、貧栄養土壌でそれらの樹木の生育を助ける。私たちは、30 年以上液体培養で継代された *Frankia alni* ACN14a 株の細胞を固体培地で培養したところ、形状の異なるコロニーを形成する 2 種類の細胞が混在することを発見した。A 型（ambiguous edge）は菌糸が放射状に伸長して輪郭がぼやけたコロニーを形成し、S 型（sharp edge）は菌糸の伸長がコロニーの縁で抑制され明瞭な輪郭を示した。両型の細胞の表層多糖の単糖組成を調べたところ違いが見られたことから、コロニー形状の違いは、バクテリアでしばしば報告されるように、細胞表層多糖の構造の相違に起因すると予想された。これらの細胞を宿主植物 *Alnus glutinosa*（セイヨウヤマハンノキ）に接種したところ、双方でほぼ同じ数の根粒が着生した。しかし、S 型を接種した植物は窒素固定活性が大きく低下していた。加えて、S 型の細胞は A 型の細胞と比較して、窒素源を含まない液体培地での生育も遅かった。以上の結果から、*Frankia* の細胞表層多糖は、共生および非共生の双方の状態の窒素固定において何らかの役割を担うと考えられた。2 系統の S 型と 1 系統の A 型のゲノム配列を解析した結果、S 型が特異的に持つ突然変異が複数見出され、これらが S 型で観察された表現型の原因である可能性が考えられた。

## P-218

### ジャガイモ葉から分離された *Methylobacterium* 属細菌の多様性

○染谷 信孝<sup>1</sup>, 海野 佑介<sup>2</sup>, 諸星 知広<sup>3</sup>, 窪田 昌春<sup>1</sup>

<sup>1</sup>農研機構・野菜花き研, <sup>2</sup>環科技研・環境影響研究部, <sup>3</sup>宇都宮大院・工・物質環境

*Methylobacterium* 属細菌は植物共生細菌として知られており、植物の生育促進能や病害抵抗性誘導能を有する菌株が報告されている。本属は、宿主植物における種レベルでの特異性があり、宿主植物によっては優占種が地理的要因に左右されないという報告があるが、これまでジャガイモにおいては地理的要因の影響は調査されていない。ジャガイモ（品種マチルダ）の種芋を、北海道、山形県、茨城県、広島県及び長崎県で慣行栽培し、開花期の葉を採取した。各葉サンプルからメタノール含有 AMS 培地で 100 株ずつ PPFM (Pink-pigmented facultative methyloph) を分離した（供試種芋から PPFM は検出されなかった）。16S rRNA 遺伝子配列の相同性から、分離株は全て *Methylobacterium* 属細菌と推定された。続いて 16S rRNA 遺伝子配列を用いて系統的多様性を評価し、クラスタリング解析（97% 類似性）した結果、分離株は 16 個の Operational Taxonomic Units (OTUs) に分かれた。北海道、山形、茨城、広島及び長崎の各サンプルから検出された OTU 数はそれぞれ、4、5、8、5 及び 6 であった。全 5 地域から共通して検出された OTU は *M. goesingense* と高い相同性を示し、北海道（84.7%）及び山形（66.0%）で最優占であった。その他、北海道を除く 4 地域から検出された OTU は、*M. aminovorans* と高い相同性を示し、広島（46.9%）及び長崎（58.2%）で最優占的であった。茨城サンプルで最優占であった OTU（35.4%）は *M. adhaesivum* と高い相同性を示した。地域特異的に検出された OTU 数は北海道、山形、広島及び長崎で各 1 ずつ、茨城で 3 であった。各 OTU 代表菌株の特性を比較した結果、バイオフィーム形成能やアシル化ホモセリンラクトン等の産生能に差が認められた。ジャガイモの場合、栽培地域によって葉の *Methylobacterium* 属の優占種が変動すると考えられた。

## P-219

## 大気水素が紡ぐ共生関係：空中の水素を取り込む植物共生微生物の生態の解明

○菅野 学, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一

産総研・生物プロセス

E-mail: manabu-kanno@aist.go.jp

水素は、約0.5 ppmvと微量ながら、メタンに次いで大気中に多く存在する還元性ガスである。近年になって、大気濃度レベルの希薄な水素を酸化しうる高親和性水素酸化細菌が土壌から発見され、大気圏の水素の約80%が陸圏に取り込まれる過程に主要な役割を担うと推定された。さらに、先の我々の研究で、高親和性水素酸化細菌は植物体にも広く棲息することが明らかとなった。しかし、大気水素の取り込みが微生物の植物共生に寄与するかは不明である。そこで本研究では、イネの体内より分離した*Streptomyces*属放線菌株が有する高親和性水素酸化酵素遺伝子の発現レポーター株および遺伝子破壊株を作製し、無菌土耕栽培したイネに接種することで、植物共生における高親和性水素酸化の生態学的意義を明らかとすることを目的とした。発現レポーター株の接種結果より、植物表面および植物体内に局在する孢子でのみGFP蛍光が観察され、菌糸体では蛍光検出されなかった。微生物が共生した植物では水素酸化活性が確認された一方、無菌植物では水素の減少が全く見られないことから、植物に共生する*Streptomyces*属放線菌の孢子によって大気水素が酸化されると考えられた。

野生株はイネの生育を増大させる特性を持つが、水素を酸化する機能を欠失した遺伝子破壊株では、この生育促進効果の低減が確認された。植物の生育促進に関連する生理学的特性を野生株と破壊株で比較したところ、顕著な違いは見られず、別の要因が考えられた。そこで、植物に定着する細胞数の違いに着目したところ、接種10日後の時点で遺伝子破壊株は細胞数が顕著に少なく、接種4週間後に植物体内から完全に消失した。これより、高親和性水素酸化細菌の植物への初期定着や共生関係の維持に大気水素の取り込みが寄与すると考えられた。また、人工培地において、遺伝子破壊株の生存率の経時的な減少が観察された。これは、栄養制限下や孢子の状態での長期生存するためのエネルギーが大気水素の酸化によって獲得されるとの近年の報告を支持する結果である。

本研究は、大気水素が関与する植物と微生物の共生関係の可能性を初めて示した。微生物が主な住処とする植物表面や導管や細胞間隙は、植物根圏に比べて有機物が常に安定的に得られるとは考えにくく、従属栄養と大気水素酸化の異なる代謝様式を併せ持つことは、そのような環境での生存に有利に働くと考えられる。

## P-220

真菌類菌糸圏から分離した *Burkholderia* 属細菌のキチン分解活性について○中西 布実子<sup>1</sup>, 高島 勇介<sup>2</sup>, 菊池 義智<sup>3</sup>, 出川 洋介<sup>4</sup>, 成澤 才彦<sup>5</sup><sup>1</sup>茨城大学・院農, <sup>2</sup>東京農工大院・連合農学, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>筑波大・生命環境, <sup>5</sup>茨城大・農

E-mail: 15am213n@vc.ibaraki.ac.jp

*Burkholderia*属細菌は、動植物の病原細菌、マメ科植物の根粒菌、そして節足動物の腸内細菌など多様な生態的位置を占める細菌群である。また、イネ苗立枯病菌 *Rhizopus microsporus* に内生し、その植物毒素生産に寄与する *B. rhizoxinica* および *B. endofungorum* が新たに報告された。そのうち *B. rhizoxinica* は、菌糸への感染に 2 型分泌装置を介したキチナーゼの分泌が重要であると考えられている。そこで、本研究では真菌類への侵入能を有する同属細菌の探索を目的とし、まず、土壌菌類および担子菌類の子実体組織より分離した同属細菌のキチン分解活性を試験した。キチン分解活性試験には、土壌菌類および子実体内部より分離した 9 菌株およびホソヘリカメムシ腸内から分離された 2 菌株を供試した。また、対照としてキチン分解活性を有する *Chitinophaga* sp. YTM198\_B を用いた。キチン分解活性はコロイダルキチン培地上に NB 培地で培養した供試菌株を塗布し、30℃ で 9 日間培養後、ハローの有無により評価した。その結果、担子菌 *Boletus* sp. の子実体から分離され、*Burkholderia gladioli* に系統的に近縁な *Burkholderia* sp. BAK2 においてキチン分解活性が確認された。*Burkholderia gladioli* はキチン分解活性を有し、抗菌作用を持つことが知られている。一方、*R. microsporus* に内生する *Burkholderia* 属細菌に系統的に近縁な *Burkholderia* sp. Rm12\_B および Rm15\_B は、キチン分解活性を示さなかった。また、担子菌 *Lyophyllum* sp. の菌糸周囲にバイオフィルムを形成することが知られる *B. terrae* に系統的に近縁な *Burkholderia* sp. ZpA3-9\_B および ZpA3-10\_B も、*B. terrae* KMY02<sup>T</sup> と同様、キチン分解活性を示さなかった。さらに、ホソヘリカメムシ腸内から分離された *Burkholderia* sp. RPE64 および RPE67、それらの姉妹クレードに位置する接合菌 *Cunninghamella elegans* から分離された *Burkholderia* sp. OHB30-1\_B もキチン分解活性を示さなかった。本研究でキチン分解活性を示した BAK2 に関しては今後、菌糸への侵入過程について詳細な試験を行う。また、*B. rhizoxinica* では、宿主への感染時に 2 型分泌装置の構成タンパクおよびキチン分解に関わる酵素をコードする遺伝子発現の上昇が確認されている。そこで、今回キチン分解活性が認められなかった 10 菌株の *Burkholderia* 属細菌についても、真菌類の存在下においてキチン分解活性を示す可能性があり、今後検討を進めていきたい。



## P-221

山崩れによりかく乱された御嶽山における根粒と根圏土壌中の  
フランキアの群集構造

○池邊 茉莉<sup>1</sup>, 中島 沙映<sup>2</sup>, 山元 巧<sup>2</sup>, 柴田 銃江<sup>3</sup>, 今矢 明宏<sup>3</sup>, 壁谷 大介<sup>3</sup>, 齋藤 智之<sup>3</sup>, 岡本 透<sup>3</sup>,  
小野 賢治<sup>3</sup>, 森貞 和仁<sup>3</sup>, 飛田 博順<sup>3</sup>, 九町 健一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大・院理工, <sup>2</sup>鹿児島大・理, <sup>3</sup>森林総合研究所

土壌放線菌であるフランキアは、ハンノキなどのアクチノリザル植物の根に根粒を形成して窒素固定を行う。フランキアとアクチノリザル植物との共生には宿主特異性が見られ、フランキアは宿主植物の異なる4つのグループ（ハンノキグループ、モクマオウグループ、グミグループ、バラグループ）に分類される。1984年の長野県西部地震による山崩れにより、御嶽山は広範囲にわたり森林がかく乱された。その後植生は徐々に回復し、その過程でハンノキ種樹木の生育が見られた。本研究の目的は森林の植生の回復過程におけるフランキアの群集構造の変化やそれを引き起こす要因を明らかにすることである。

御嶽山の標高2000 m付近に設定された5つのかく乱プロット（B1、B2、B3、P7、P22）および残存森林から、2012年と2014年に採取したミヤマハンノキとヤハズハンノキの根粒と、それらの根圏土壌を実験に用いた。P7は残存森林に接しており土壌の肥沃度と植生の回復度が高くミヤマハンノキの生育が見られた。P7に比べてB1、B2、B3、P22は肥沃度が低く、植生の回復度も低かった。B1、B2ではミヤマハンノキが、B3ではヤハズハンノキが生育していた。P22は残存森林からもっとも離れており、ミヤマハンノキとヤハズハンノキが見られた。採取した根粒と土壌から全DNAを抽出し、特異的なプライマーでフランキアの窒素固定関連遺伝子 *nifH* を増幅して塩基配列を決定し、系統解析を行った。

検出された配列は全てハンノキグループであり、大部分は3つのクレード（C型、D型、E型）に分類された。根粒中と根圏土壌中のフランキアの型は対応する場合としない場合とがあった。例えばB3では根粒・土壌ともにC型が見られたが、B1では根粒ではC型が、土壌ではD型が検出された。また、残存森林ではC型・D型に加えて、これらのクレードには属さないものも複数見られたが、P22ではC型しか見られなかった。これらの結果から、かく乱直後は生息するフランキアの型は少ないが、土壌の肥沃度が増し植生の回復が進むにつれて、フランキアの群集構造に変化が起こり多様性が高まると考えられた。



## P-222

***Mortierella*属菌に内生する細菌 *Mycoavidus* spp. が宿主の孢子嚢形成に与える影響について**○高島 勇介<sup>1</sup>, 太田 寛行<sup>2</sup>, 成澤 才彦<sup>2</sup><sup>1</sup>東京農工大院・連合農学, <sup>2</sup>茨城大・農

当研究グループは、ケカビ亜門菌類である *Mortierella elongata* より、内生細菌 *Mycoavidus cysteinexigens* を分離し、さらに *M. elongata* 以外の *Mortierella* 属菌においても *Mycoavidus* spp. が存在することを明らかにした。今までに、*M. elongata* FMR23-6 において、*M. cysteinexigens* 非保有株は、保有株と比較して気中菌糸が旺盛に伸長することが観察されていたが、*Mycoavidus* spp. が、宿主に与える影響については明確に示されていない。*Mortierella* 属菌には、気中菌糸上に孢子嚢を形成する種があり、気中菌糸形成の有無は孢子嚢形成に影響を与えると考えられる。そこで、本研究では *Mycoavidus* spp. 保有株および非保有株を観察、比較することで *Mycoavidus* spp. による気中菌糸および孢子嚢形成に与える影響を調査した。*Mycoavidus* spp. 保有 *Mortierella* 属菌 10 種 18 菌株を供試し、貧栄養な LCA 培地における培養および培養寒天片を滅菌水に水没させることにより孢子嚢形成を誘導した。その結果、18 菌株中 13 菌株より孢子嚢形成を確認した。次に孢子嚢形成が見られた 13 菌株に対して、単孢子嚢孢子分離により、それぞれ 8 ~ 15 の単孢子分離株を確立し、バクテリア 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを用いた PCR により各単孢子分離株における内生細菌の有無を確認した。その結果、単孢子分離株を確立した 13 菌株すべてより、内生細菌の PCR 増幅を確認した。一方、*Mortierella minutissima* YTM23 および *Mortierella parvispora* YTM39 において、それぞれ 2 および 6 単孢子分離株より内生細菌の PCR 増幅はなかった。PCR 増幅がなかった単孢子分離株は、バクテリア特異的プローブを用いてそれぞれ 1 株ずつ孢子嚢孢子的 FISH 観察を行ったが、孢子嚢孢子内に細菌が確認できなかった。次に、YTM23 および YTM39 の *Mycoavidus* spp. 保有株および非保有株を LCA 培地上で 10 日間培養し、気中菌糸および孢子嚢形成の有無を経時的に観察した。その結果、YTM23 および YTM39 において、*Mycoavidus* spp. の有無による気中菌糸および孢子嚢形成への影響は見られなかった。これらの結果は、*Mortierella* 属菌の孢子嚢孢子的に *Mycoavidus* spp. が移行し、*Mycoavidus* spp. が孢子嚢孢子的を介して分散する可能性を示唆している。また、先行研究より YTM39 において、内生細菌保有株における接合孢子形成阻害が確認されている一方、内生細菌の有無に関わらず、気中菌糸および孢子嚢が形成されることが確認された。

## P-223

***Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*病原力関連遺伝子の網羅的解析と感染機構の可視化**○丸山 望<sup>1</sup>, 清川 達則<sup>1</sup>, 石賀 貴子<sup>2</sup>, 石賀 康博<sup>2</sup>, 別役 重之<sup>2</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 一瀬 勇規<sup>3</sup>, 野村 暢彦<sup>2</sup><sup>1</sup>筑波大・院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系, <sup>3</sup>岡山大・院・環境生命

E-mail: s1621176@u.tsukuba.ac.jp

世界の作物生産を100%に例えると、30%が雑草、虫害、病害により失われている。その半分の約15%(8億人分の食料と試算)が植物病害に起因している。今後、安定的な食糧生産を得るために病害による損失を抑える必要があり、植物 - 微生物間相互作用の解明が求められる。感染は病原菌が植物に付着・侵入して、両者の間に栄養授受関係が成立することによって成立する。これまでの研究において、病原菌の植物葉表面での感染メカニズムは付着・侵入・攻撃・増殖の順序で植物宿主に対する感染を成立させると考えられてきた。しかし、実際の感染現場においてそのような感染過程の詳細な観察はなされていない。例えば、病原細菌の植物への付着に重要だと考えられるBiofilm形成や植物体侵入時の運動性と、病原力との関わりも未だによくわかっていない。そこで、本研究では植物病原細菌の病原性機構を一細胞レベルでの微生物生態学的研究によって明らかにすることを目指した。まず、病原細菌各感染過程に関与する遺伝子を探索するため、病原力が低下する*P. syringae* pv. *tabaci*の遺伝子変異株ライブラリーを用いた。各変異株において、植物葉上での挙動に重要であると考えられる表現型(運動性およびBiofilm形成など)を網羅的に解析した。さらに、当研究室ではCOCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy)法と蛍光検出法を組み合わせることによって、植物葉構造と一細胞レベルの微生物を同時にリアルタイムで観察することに成功している。現在、上記の網羅的解析によって選抜された病原性関連遺伝子欠損株にGFPを挿入した株を新たに作成し、タバコ植物*Nicotiana benthamiana*に付着させ、上記のリアルタイムイメージング系を用いて葉上での感染過程における細菌の挙動と局在を観察している。このように、各種病原力遺伝子欠損により付着・侵入・攻撃・増殖と続く感染行動がどう変化するのか、その結果としてどう病原性機構に影響してくるのかを明らかにし、植物-微生物間相互作用の実態に迫ることを本研究の目的とした。

## P-224

### **A dark septate endophyte *Veonaeopsis simplex* Y34 alters the root-endospheric community and suppresses Fusarium crown and root rot disease of tomato**

○Yong Guo, Tomoyasu Nishizawa, Hiroyuki Ohta, Kazuhiko Narisawa

Ibaraki University College of Agriculture

E-mail: yong.guo.1985@vc.ibaraki.ac.jp

Fusarium crown and root rot (FCRR) of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) is a common disease in worldwide. Our previous study showed the suppressive role of a dark septate endophyte *Veonaeopsis simplex* Y34 against Fusarium disease of Chinese cabbage, suggesting a potential bio-control agent to suppress FCRR of tomato. The aims of this study was to: 1) examine the suppressive potential of *V. simplex* Y34 against the FCRR of tomato; 2) explore the effect of *V. simplex* Y34 on root-endospheric community and how such effect links to the suppression of the disease. Two cultivars of tomato, House-momotaro and sicily-anrujo, were used in this experiment. The solid-cultures of *V. simplex* Y34, was applied in a nursery pot to assess the bio-control of the disease. Results showed that *V. simplex* Y34 decreased the disease severity of FCRR for the two cultivars. The colonization of *V. simplex* Y34 in root was determined by re-isolation and T-RFLP profiles targeting fungal ITS-LSU region. Moreover, the application of the endophyte increased the diversity and evenness of fungal community in root-endosphere and decreased the colonization of FORL in the root. NMDS analysis of T-RFLP profiles showed that the fungal communities in root-endosphere with inoculation of *V. simplex* Y34 were clustered away from those of non-inoculation, suggesting a correlation between the root-endospheric community and disease incidence. In conclusion, this study indicates that the application of *V. simplex* Y34 altered the diversity, evenness and structure of root-endospheric fungal community by the endosymbiosis of endophyte, and decreased pathogen colonization in the root, which opens up a new way to control of tomato FCRR disease. This work was supported by Council for Science, Technology and Innovation (CSTI), Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program (SIP), “Technologies for creating next-generation agriculture, forestry and fisheries”.

## P-225

### **Comparative genomics of two betaproteobacterial endohyphal symbionts: *Mycoavidus cysteinexigens* and *Burkholderia rhizoxinica*.**

○Dilruba Sharmin, Yong Guo, Tomoyasu Nishizawa, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta

Ibaraki University, College of Agriculture

E-mail: sharmin.bau@gmail.com

Several members of the bacterial family, *Burkholderiaceae*, live as an endosymbiont associated with fungi. So far, two endohyphal bacteria belonging to this family had been isolated and characterized as new taxa, *Mycoavidus cysteinexigens*, and *Burkholderia rhizoxinica*. *M. cysteinexigens* B1-EBT is known to harbor a non-pathogenic fungus *Mortierella elongata*, whereas *B. rhizoxinica* HKI 454T is an endosymbiont of a phytopathogenic fungus *Rhizopus microspores*. In this study, we compared the genomes of these two endosymbionts to analyze the potential host-symbiont interactions, host adaptations and diverse host species distributions. The genome of strains B1-EBT and HKI 454T consisted of 2.79-Mbp and 3.75-Mbp nucleotide sequences with 48.9% and 60.7% G+C content and containing 2,317 and 3,870 coding sequences (CDSs), respectively. Despite these two bacteria have different host fungi, the whole alignment of amino acid sequences deduced from the B1-EBT and HKI 454T genome sequences using BLASTP identified 239 CDSs in chromosomal genome and 15 in two plasmids of HKI 454T with over 60% identity and 286 CDSs in chromosome with over 60% similarity. The amino acid sequence assessment analysis revealed that B1-EBT has 13 similar proteins related to DNA replication and repair, 29 ribosomal proteins, 26 proteins related to ATP synthesis, 24 membrane transport proteins and transposase and inactivated derivatives with HKI 454T. However, no common functional gene cluster involved in host-symbiont interactions was found. Our results indicated that the symbiosis between the fungus *M. elongata* and the endohyphal bacterium *M. cysteinexigens* B1-EBT was considerably different from the fungal symbiosis mechanism of *B. rhizoxinica* HKI 454T with the phytopathogenic *R. microspores*.

## P-226

**Effect of dark septate endophytic fungi treatment on the belowground microbial community of the Allium plant**

○ Han Sun<sup>1</sup>, Yong Guo<sup>1</sup>, Hiroyuki Uga<sup>2</sup>, Tomoyasu Nishizawa<sup>1</sup>, Kazuhiko Narisawa<sup>1</sup>, Hiroyuki Ohta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Agri., Ibaraki Univ., <sup>2</sup>Saitama Agricultural Technology Research Center

E-mail: 15am210h@vc.ibaraki.ac.jp

Soil microorganisms play an important role in the nutrient acquisition for plants. With the increasing concerns for environmental friendly farming, low input agricultural practices using microbial agents will be promising for the enhancement of plant growth and the induction of tolerance to various stresses. Our recent studies showed that dark septate endophyte (DSE) fungi could help several plants to grow under unfavorable environmental conditions. In this study, we aimed to analyze the effect of DSE fungi on the belowground microbial community of the Allium plant. Allium (*Allium fistulosum*) was grown in a commercial culture soil (Ginnobaido) inoculated with each of DSE fungi, *Phialocephala fortinii* LtPE2 or *Veronaeopsis simplex* Y34, in a nursery pot. A couple of DSE treatments at different soil pH (5.0 and 6.5) were prepared to examine the effect of pH on DSE colonization in plant. Total DNAs of rhizosphere and endophytic communities were subjected to T-RFLP profiling analyses targeting bacterial 16S-rRNA gene and fungal ITS region. *V. simplex* Y34 colonized successfully on the plant root, while *P. fortinii* LtPE2 did not. The DSE colonization was more efficient at pH 5.0 than at pH 6.5. Fungal diversity index was 1.48, 1.30, 3.01, 2.30 and 2.85, whereas bacterial diversity were 3.71, 3.70, 3.91, 3.23 and 3.38 for the treatments with *P. fortinii* LtPE2 (pH 5.0), *P. fortinii* LtPE2 (pH 6.5), *V. simplex* Y34 (pH 5.0), *V. simplex* Y34 (pH 6.5) and control group, respectively. ? These results suggest that the high degree of DSE colonization with *V. simplex* Y34 at pH 5.0 resulted in higher microbial diversity. NMDS ordination on the T-RFLP profiles of rhizosphere soil showed a distinct clustering of communities across the treatments, suggesting the influence of the DSE treatment on the bacterial and fungal communities. This work was supported by Council for Science, Technology and Innovation (CSTI), Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program (SIP).



P-227

## Microbial community structure and soil properties in the rhizosphere of understory dwarf bamboo in *Betula ermanii* forest, northern Japan

○Bihe Kong<sup>1</sup>, Lei Chen<sup>1</sup>, Yasuhiro Kasahara<sup>1</sup>, Akihiro Sumida<sup>1</sup>, Kiyomi Ono<sup>1</sup>, Arata Nagatake<sup>2</sup>, Ryusuke Hatano<sup>2</sup>, Jan Wild<sup>3</sup>, Toshihiko Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ILTS., Hokkaido Univ., Japan, <sup>2</sup>Grad. Sch. of Agri., Hokkaido Univ., Japan, <sup>3</sup>Institute of Botany, CAS., Czech Republic

E-mail: bhkong@lowtem.hokudai.ac.jp

To understand the relationships between understory bamboos and soil properties, we compared microbial communities structure of rhizosphere soil of *Sasa kurilensis* with *Sasa-removed* soil in a *Betula ermanii* boreal forest by a high-throughput DNA sequencing method. Understory *Sasa* strongly affected soil properties, such as total carbon, total nitrogen, nitrate and C:N ratio. Among fungal communities, the relative abundance of phylum *Ascomycota* in libraries was 13.9% in the *Sasa*-intact plot, while it was only 0.54% in the *Sasa*-removed plot. Most abundance value of phylum *Ascomycota* was attributed to family *Pezizaceae*. As for bacterial communities, phyla *Acidobacteria*, *Proteobacteria* and *Planctomycetes* were significant differences between the *Sasa*-intact and *Sasa*-removed plots. We found that the *Pezizaceae*, known as mycorrhizal fungi, was related to the amount of total carbon in the *Sasa*-intact plot. The lower abundance of genus *Cryptococcus* in the *Sasa*-intact plot than that in the *Sasa*-removed plot confirmed that the rhizosphere of *Sasa* had a drier soil environment. Furthermore, the species richness results suggested that bacterial phyla may have symbiotic species with ectomycorrhizas under the presence of *Sasa*. These results indicated that microbial communities in rhizosphere of *Sasa* under drier soil environments have function to change soil properties in *B. ermanii* boreal forest.

## P-228

難培養性細菌群 *Armatimonadetes* 門に属する新規細菌 LA-C6 株によるウキクサ亜科植物の生育促進

○岩下 智貴<sup>1</sup>, 田中 靖浩<sup>2</sup>, 玉木 秀幸<sup>3</sup>, 立野 由佳<sup>1</sup>, 米田 恭子<sup>3</sup>, 牧野 彩花<sup>3</sup>, 遠山 忠<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>3</sup>, 森川 正章<sup>4</sup>, 森 一博<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山梨大・工, <sup>2</sup>山梨大・生命環境, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>北大院・環境

E-mail: g16tr001@yamanashi.ac.jp

ウキクサ亜科植物の多くは葉と茎が融合した葉状体と根で構成される浮遊性の水生植物で、デンプンやタンパク質を多く含有することから、バイオエタノール等のエネルギー生産資源や家畜の飼料としての利用が検討されている。このような背景から、我々はウキクサ亜科植物の生育促進効果を示す微生物 (Plant Growth Promoting Bacteria ; PGPB) を検索するとともに、それらを利用したバイオマス生産能の高いウキクサ亜科植物の創製を試みている。一方、*Armatimonadetes* 門細菌 (以前は Candidate phylum OP10 として知られる) は難培養性の細菌群で、既知菌種としては *Armatimonas rosea*, *Chthonomonas calidirosea*, *Fimbriimonas ginsengisoli* の 3 種が報告されるのみであるが、我々はこれまでにウキクサ亜科植物の葉状体または根から上記の既知菌種とは系統の異なる 4 株の *Armatimonadetes* 門細菌の分離培養に成功している。今回はこれら 4 株のうち、アオウキクサの葉状体から分離された LA-C6 株 (*F. ginsengisoli* と 92% の相同性 (16S rRNA 遺伝子)) においてウキクサ亜科植物に対する生育促進活性 (PGP 活性) が新たに認められたため、その性質について報告する。LA-C6 株を無菌のコウキクサに接種・共培養し、無菌対照区との比較により PGP 活性を評価した。その結果、本菌株は無菌対照区と比べて葉状体数を最大 2.8 倍の PGP 活性を有することが分かった。また、複合微生物群集存在下 (下水二次処理水中) においても最大 2 倍の活性を示し、これは既報のウキクサ亜科植物の PGPB である *Acinetobacter calcoaceticus* P23 株の PGP 活性とほぼ同等であった。なお、陸生植物の PGPB が有する代表的な生育促進因子 (シデロフォア生産能、インドール-3-酢酸生産能、リン酸可溶化能) を測定したところ、シデロフォア生産能の活性が確認された。現在、LA-C6 株のウキクサに対する定着性、局在性を調べるために、本菌株を特異的に検出できる PCR プライマーの作製について検討中である。

## P-229

## ウキクサの葉状体と根に集積するフェノール分解菌の分離と比較

○大内 源樹<sup>1</sup>, 田中 靖浩<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 新村 杏菜<sup>1</sup>, 米田 恭子<sup>2</sup>, 牧野 彩花<sup>2</sup>, 遠山 忠<sup>3</sup>, 鎌形 洋一<sup>2</sup>, 森川 正章<sup>4</sup>, 森 一博<sup>3</sup>

<sup>1</sup>山梨大・生命環境, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>山梨大・工, <sup>4</sup>北大院・環境

ウキクサは葉状体と根で構成される浮遊性の水生植物である。これまでに、ウキクサによる様々な有害化学物質の分解例が多数報告されており、その分解能はいずれも根に生息する微生物に由来するものであると考えられてきた。しかし、我々は、ウキクサの葉状体にも有害化学物質の分解に関与する微生物が生息し、それらは根に生息する分解菌とは種類が異なることを明らかにしてきた（環境微生物系学会合同大会2014要旨集p. 153）。このことは、ウキクサを有害化学物質分解菌の分離源とする場合に、根と葉状体の両方をターゲットとすることで、より多くの種類の分解菌が取得できる可能性を示唆するものである。そこで本研究では、環境試料を接種したウキクサを有害化学物質（モデル物質としてフェノールを使用）で馴化することで、葉状体と根に異なる当該物質分解菌が集積・分離培養されるかを調べることにした。無菌のウキクサを河川水にて1日間栽培後（河川水中の微生物群集の接種）、滅菌済みの水生植物栽培用培地に移し、50 ppmフェノール存在下で栽培（馴化）した。5日間のフェノール馴化を1バッチとして計3バッチ行い、各バッチにおける培地中のフェノール濃度を測定したところ、いずれのバッチにおいてもフェノールの分解が確認され、その分解能はバッチ数が増えるとともに向上した。各バッチ終了後のウキクサの葉状体と根からDTS（Tryptic soy brothを100倍希釈したもの）平板培地にて微生物を分離し、その中からフェノール脱水素酵素遺伝子（*dmpN*）の有無を指標にフェノール分解菌の検索を行った。その結果、葉状体から27株/96株（1バッチ；5株/32株、2バッチ；15株/32株、3バッチ；7株/32株）、根から25株/96株（1バッチ；7株/32株、2バッチ；8株/32株、3バッチ；3株/32株）の分解菌を得た。取得した分解菌株の系統分類を16S rRNA遺伝子配列に基づき行ったところ、12属に分類され、このうち5属（*Leptothrix*属、*Rhodoferax*属、*Asticcacaulis*属、*Dechloromonas*属、*Pseudomonas*属）が葉状体、3属（*Acinetobacter*属、*Flavobacterium*属、*Flectobacillus*属）が根に特異的であった。

## P-230

水生植物ウキクサの成長を促進する新規*Acidobacteria*門細菌F-183株とTBR-22株の生理性状および共生的機能の解析

○米田 恭子<sup>1</sup>, 牧野 彩花<sup>1</sup>, 田中 靖浩<sup>2</sup>, 遠山 忠<sup>2</sup>, 森 一博<sup>2</sup>, 池 道彦<sup>3</sup>, 森川 正章<sup>4</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>産総研・生物プロセス, <sup>2</sup>山梨大学, <sup>3</sup>大阪大学, <sup>4</sup>北海道大学

【背景と目的】植物の成長を促進するPGPB(plant growth promoting bacteria)は植物の生理生態に大きな影響を及ぼすと考えられており、PGPBの生理性状および植物との相互作用の解明は重要な研究課題の一つである。当研究グループでは、栄養価が高く食料やバイオマスとしての利活用が検討されている水生植物ウキクサに着目して、ウキクサのPGPB探索と植物成長促進機構の解明を行っている。本研究では培養頻度が低い系統群として知られる*Acidobacteria*門に属する新規PGPBを2株発見し、その生理性状およびウキクサに対する植物成長促進効果(PGP効果)を解析した結果について報告する。

【方法】野生ウキクサの根および葉状体試料から、低栄養性の平板培地を用いて微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析を行うとともに、無菌ウキクサとの共培養に供してPGP効果を評価した。PGP効果については、ウキクサの葉状体数およびクロロフィル含有量について無菌対照区および既報のPGPBである*Acinetobacter calcoaceticus* P23株と比較することで評価した。

【結果と考察】野生ウキクサの*Spirodela* sp. および*Lemna* sp. の葉状体よりそれぞれF-183株およびTBR-22株の2株を分離した。分子系統解析の結果、両株は*Acidobacteria*門細菌であり、F-183株はSubdivision 3、TBR-22株はSubdivision 6に属することが分かった。F-183株とTBR-22株を様々なウキクサ亜科植物(*Spirodela*属、*Landoltia*属、*Lemna*属、*Wolffia*属)と共培養したところ、無菌対照区に比べてウキクサの葉状体数を約2倍に増加させるとともに、クロロフィル含有量を約3倍増加させる効果が見られ、P23株を上回るPGP効果を示した。これまでよく知られているPGPBは陸上植物のものであり、*Proteobacteria*門や*Firmicutes*門、*Actinobacteria*門に属している。F-183株とTBR-22株は、これまでほとんど知見のない水生植物のPGPBであり、また既存の陸上植物PGPBと系統が大きく異なる*Acidobacteria*門細菌に属していることから、植物に対して何らかの新しい共生的機能を持つのではないかと考えている。



## P-231

**水生植物ウキクサからの難培養性細菌群 *Verrucomicrobia* 門細菌および *Armatimonadetes* 門細菌の分離培養**

○戸澤 恵里奈<sup>1</sup>, 田中 靖浩<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 新村 杏菜<sup>1</sup>, 米田 恭子<sup>2</sup>, 牧野 彩花<sup>2</sup>, 遠山 忠<sup>3</sup>, 鎌形 洋一<sup>2</sup>, 森川 正章<sup>4</sup>

<sup>1</sup>山梨大・生命環境, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>山梨大・工, <sup>4</sup>北大院・環境

これまでに我々はウキクサ亜科植物の葉状体と根から難培養性の細菌群として知られる *Verrucomicrobia* 門細菌を高頻度で分離培養するとともに、これまでに既知菌種として3種しか報告されていない *Armatimonadetes* 門細菌（以前は Candidate phylum OP10）を新たにウキクサの根から2株、アオウキクサの葉状体から1株を分離培養することに成功してきた。このことは、ウキクサ亜科植物が他の環境試料と比べ、上記2門に属する細菌の分離培養源として期待できることを示唆するものである。そこで本研究では、未知微生物資源開拓の観点から、ウキクサ亜科植物の葉状体および根をターゲットとした *Verrucomicrobia* 門細菌と *Armatimonadetes* 門の網羅的な分離培養について検討することとした。微生物分離源として無菌のウキクサに環境試料（河川水）を接種し、一定期間（1バッチ5日間を計3バッチ；計15日間）栽培したものを用いた。葉状体および根由来の338株を対象とし、*Verrucomicrobia* 門細菌または *Armatimonadetes* 門細菌に特異的なプライマーを用いたコロニー PCR法により、これら2つの門に属する菌株のスクリーニングを行ったところ、*Verrucomicrobia* 門に属する菌株を7株、*Armatimonadetes* 門細菌に属する菌株を1株取得できた。得られた菌株を16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析に供した結果、*Verrucomicrobia* 門細菌に属する菌株は *Opitutae* 綱、*Spartobacteria* 綱、*Verrucomicrobiae* 綱のいずれかに属し、これらの中には既知菌種 (*Xiphinematobacter rivesi*) との相同性が82.8%と非常に新規性の高い菌株も含まれていた。一方、*Armatimonadetes* 門細菌に属する菌株は既知種の *Fimbriimonas ginsengisoli* と近縁ではあるものの（90.5%の相同性）、少なくとも属レベルで新規であることが明らかとなった。また、微生物分離に用いた各サンプルから抽出したDNAをターゲットとし、16S rRNA アンプリコン解析（NGS解析）を行ったところ、ウキクサは葉状体と根の両方に *Verrucomicrobia* 門と *Armatimonadetes* 門を集積する傾向にあることが示された。



## P-232

## 概日時計機構を有するウキクサ根圏微生物の探索

○寺戸 菜穂<sup>1</sup>, 北川 航<sup>1,2</sup>, 曾根 輝雄<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1,2</sup>, 加藤 創一郎<sup>1,2</sup><sup>1</sup>北大院農, <sup>2</sup>産総研生物プロセス

E-mail: naho0713@eis.hokudai.ac.jp

【背景と目的】概日時計は地球上における24時間周期の環境変動に適応するための体内リズムであり、生物の様々な生理機能を調節することに関わっている。概日時計は動植物だけでなく昆虫やカビに至るまで、すべての真核生物に存在すると考えられている。一方、原核生物で概日時計の存在が実証されているのはシアノバクテリアなどの光合成微生物だけである。しかし光が直接当たらない環境にも24時間周期の環境変動は存在する。例えば植物の根圏環境では、昼間は植物の根から光合成由来の有機物や酸素が供給されるが、夜間にはその供給が停止する。概日時計機構を有することは、このような日周変動環境に生きる微生物に競争的なメリットを与えるものと予想される。そこで本研究では、概日時計機構を有する微生物を同定・取得することを最終的な目的とし、異なる光照射サイクル下で培養したウキクサの根圏微生物の群集構造を比較することで、日周変動環境で優位に生育可能な微生物の特定を試みた。【方法と結果】北海道大学ポプラ並木横にある池からコウキクサ (*Lemna minor*) を採取し、滅菌水で軽く洗浄後、三角フラスコ中の無機培地に接種した。コウキクサの培養は4つの異なる光照射条件 (7,12,17時間ごとの明暗サイクルと恒常光条件) で各4本ずつ行い、2週間の培養後に継代し、計2回の継代培養を行った。集積培養後、コウキクサ全体からDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子をPCR増幅し、次世代シーケンス解析による菌叢解析を行った。4つの条件すべてにおいて優占化した微生物 (*Rhizobium* 属、*Sphingomonas* 属に近縁) がいる反面、各条件でのみ優占化する微生物も検出された。*Acidovorax* 属や *Sphingopyxis* 属に近縁の微生物は恒常条件以外の3つの変動する環境で優占的に検出されたため、変動する環境に適応する能力が高いものだと予測される。一方恒常条件下でのみ優占化した微生物 (*Roseomonas* 属に近縁) も存在し、これらは変動する環境に適応する能力が低い微生物だと考えられる。12時間の明暗サイクルでのみ優占的に生育する微生物として、*Roseococcus* 属、*Rhodococcus* 属、*Roseomonas* 属、*Sphingopyxis* 属、*Microbacterium* 属に近縁な5種が検出された。これらは概日時計機構を有し、日周変動環境で優先して生育することのできる微生物であると予想される。現在、それぞれの光サイクル条件で培養したウキクサ根圏からの微生物の単離・同定を試みている。

## P-233

## あなたのウイルスゲノムを分類します

○西村 陽介<sup>1</sup>, 吉田 天士<sup>1</sup>, 緒方 博之<sup>2</sup>, 五斗 進<sup>2</sup><sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>京都大・化研

E-mail: nisimura@kais.kyoto-u.ac.jp

ウイルスはヒトや家畜などの動物及び農作物への感染により、毎年大きな損害を与えるだけでなく、ラン藻や藻類などの微生物にも感染し、地球上のあらゆる生態系に対して多大なる影響を与えている。現在解読されている 10,000 以上のウイルスゲノムは、広く保存された遺伝子を持っておらず、驚くべき配列多様性を示す。ウイルスはこのように医学・薬学・農学・生態学分野での研究対象として重要であるばかりでなく、生命進化に対する重大な関与も指摘されている。近年では次世代配列解析技術の発達にともない、環境中から単離することなくウイルスゲノムを解読した報告が増加してきている。また、単離されたウイルスのゲノム配列解読コストも年々減少する傾向にある。しかし、ウイルスゲノムの配列多様性は非常に大きいため、新しく得られたウイルスゲノムに最もよく似た既知のウイルスを探索したり、配列類似性に基づく分類を行ったりすることは容易ではなく、時に多大なる労力を要する。そこで我々は、新規ウイルスゲノム分類のためのツール「ViPTree Server (仮)」を開発中である。ユーザーが得たゲノム配列をウェブサーバーにアップロードすることにより、ゲノム配列相同性に基づいて、そのウイルスを含んだゲノム系統樹が作成される。これによりユーザーはウイルス系統及び、類似するウイルスゲノムを知ることができる。また、類似するウイルスゲノムとの間の配列アラインメントやドットプロットによってどの部分が類似しているかを確認できる。これらの図はインタラクティブに調整可能であり、ベクター画像としてダウンロードできる。さらに、このツールはゲノム配列中の遺伝子予測を行い、それぞれに対して相同性の高い遺伝子の情報を提供する。このツールを活用することで、例えば、新規ウイルスゲノムの進化・機能解析や、複数のウイルスゲノムの比較を手軽に行うことが可能である。

## P-234

**超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* に感染する新規溶原化ウイルスの増殖様式に関する一考察**

○弓矢 真穂, 藤原 慎, 吉田 天士, 左子 芳彦

京都大・院農

【背景】超好熱古細菌 *Aeropyrum* 属ではゲノムシンテニーが高度に保存されているが、シンテニーの崩壊がウイルス関連遺伝子に認められ、ウイルス駆動のゲノム多様化が引き起こされていると示唆された。本属とウイルスの多様な相互作用を詳細に探るべく、本研究では本属感染性ウイルスを分離し、その特徴付けを試みた。【方法】鹿児島県山川熱水環境より採取した砂を JXTm 培地に添加し、90°C で *A. pernix* を集積培養した。本種の増殖を確認した後、PEG 沈殿法で濃縮した環境ウイルスをバッファー (20 mM Tris-acetate pH7.0) に懸濁した。同環境より分離した本種を宿主として、環境ウイルス接種区、バッファー添加区と無添加区の各系を培養し、ウイルス画分を調製して透過型電子顕微鏡で観察した。バッファー添加区から精製したウイルスと宿主から DNA を抽出し、MiSeq でゲノム解析を行った。定量的 PCR 法を用いて、バッファー添加区および無処理区における宿主細胞内/上清中のウイルスゲノムコピー数の経時変化を調べた。培養液の吸光度を測定することで、バッファー添加区、本ウイルス接種区と無添加区における宿主の増殖を比較した。【結果】環境ウイルス接種区とバッファー添加区のみで直径 60nm の球状ウイルス様粒子が観察されたため、バッファーによって宿主と共存する溶原化ウイルスの複製が誘導されたと考えられた。用いた宿主のドラフトゲノム配列上には、本ウイルスゲノムと一致する領域は認められず、宿主ゲノムに対するウイルスゲノムコピー数は小さいと考えられた。バッファー添加後 24 時間以降にのみ、ウイルスゲノムは細胞内と培養上清に検出され、72 時間後には宿主ゲノムコピー数より 100 倍以上高くなった。ウイルスの生活環として、溶原および溶菌サイクルが知られている。古細菌ウイルスは宿主染色体に溶原化する、または宿主を明確に溶菌せず恒常的に増殖する (carrier state) 例が多い。しかしながら本ウイルスは、非自律的な増幅を行うエピソームとして、培養液中のごく一部の宿主細胞内に存在し、誘導条件下においては急速に複製され、成熟したウイルスは細胞外へ放出されることが考えられた。さらに、バッファー添加区では 24 時間以降に増殖阻害が認められたが、ウイルス画分添加区では 8 時間以降に、より著しい増殖阻害が認められた。このため、細胞外へ放出されたウイルスは周囲の細胞に感染すると示唆された。

**P-235**

## **Genome sequences of two giant viruses infecting *Prymnesium kappa* (Haptophyta)**

○ Romain Blanc-Mathieu<sup>1</sup>, Hiroyuki Ogata<sup>1</sup>, Ruth-Anne Sandaa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bioinformatics Center, Kyoto Univ., <sup>2</sup>Department of Biology, Bergen Univ.

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

Nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV) infect hosts across the entire eukaryotic tree of life. Large genome size and atypical gene content have fostered genomic studies of these viruses. PkV RF01 and PkV RF02 are two putative members of the Mimiviridae family<sup>1</sup>. They infect *Prymnesium kappa*, a single-celled organism of the Haptophyte eukaryotic super-group, thereby extending the known phylogenetic breadth of NCLDV's hosts. Here we report their genome sequences, assembled from Illumina short paired-end reads. PkV RF01 and PkV RF02 genome sequences are 816 kb and 487 kb long with 756 and 493 protein-encoding genes, respectively. This makes them the first and third largest marine NCLDV described so far. Their gene content will be presented with a special focus on the ones involved in DNA repair<sup>2</sup>.  
References: 1. Johannessen, T. V. et al. Characterisation of three novel giant viruses reveals huge diversity among viruses infecting Prymnesiales (Haptophyta). *Virology* 476, 180 ? 188 (2015). 2. Blanc-Mathieu, R. & Ogata, H. DNA repair genes in the Megavirales pangenome. *Curr. Opin. Microbiol.* 31, 94 ? 100 (2016).

## P-236

# Formation and stability of extracellular antibiotic resistance plasmid pool in seawater under existence of ciliate and heterotrophic nanoflagella

○Thi Lan Thanh Bien, Vy Thao Ngo, Shin-Ichi Kitamura, Yumiko Obayashi, Satoru Suzuki

Ehime University

E-mail: bethanh001@gmail.com

**【Background and aim】** Extracellular DNA (exDNA) found in natural aquatic environment plays a role in horizontal transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) among bacterial communities by probably natural transformation. exDNA is released from bacteria by various mechanisms. We aim to demonstrate the involvement of marine ciliates and heterotrophic nanoflagellates (HNFs) in the release/leakage of multi-drug resistance transferable plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strain 04Ya311. **【Results】** Quantitative detection of pAQU1 was performed by qPCR targeted tet(M) coded on the pAQU1. In seawater microcosms containing 04Ya311 and ciliates, the marked increase of extracellular tet(M) was found at day-3 of incubation, while in microcosms containing 04Ya311 and HNFs, the highest copy number of extracellular tet(M) was reached at day-20. The addition of low concentration of oxytetracycline (OTC, 10  $\mu$ g/mL) was not effective to increase of extracellular tet(M). Under presence of ciliates, no significant loss of plasmid from bacterial cells was observed during the incubation with and without OTC. While under presence of HNFs, the addition of OTC accelerated loss of plasmid in cell fraction. In any cases, released/leaked tet(M) was stably present through the incubation period. **【Conclusion】** The results provide an insight into the effect of prey-predator interactions on plasmid behavior in microbial community, probably leading horizontal transfer of ARGs in marine environment. exDNA should be a pool of ARGs. This will be valuable evidence for risk assessment and management of marine environmental ARGs.



## P-237

## 長期調査による珪藻とそれに感染するウイルスの生態学的関係の解明

○木村 圭<sup>1</sup>, 外丸 裕司<sup>2</sup><sup>1</sup>佐賀大・低平沿岸セ, <sup>2</sup>水産機構・瀬戸水研

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

小型浮遊性珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* は、夏季を中心に沿岸域でブルームを形成する。これまでの研究から、複数のウイルスが *C. tenuissimus* に感染することが分かっていた。また、室内培養実験を主体にした研究からは、ウイルス種変遷に影響する感染環境特性の違いが明らかになってきた。そこで本研究では、珪藻の挙動と水質や気象等の環境、そしてウイルス種との関係を、これまで以上に詳細かつ総合的に評価する事を目的に、これまでの5年に亘る現場定点調査の結果を精査した。本研究では、水産研究教育機構・瀬戸内海区水産研究所の棧橋において、2010年4月から2015年3月の5年間にわたって、最高週4回の頻度で調査を実施した。調査では、表層海水の水温・塩分濃度等の環境情報、栄養塩 (DIN, PO<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>) 濃度に加え、珪藻 *C. tenuissimus* 現存量、ウイルス力価を測定した。調査期間を通して、毎年7～9月に必ずウイルスが検出された。また2種のウイルス (RNAウイルス, DNAウイルス) の内、7月には優占的にRNAウイルスが出現し、8月以降にはDNAウイルスが出現することが分かっていた。グラフに基づいた解析からRNA出現と海水の塩分低下が密接に関係している可能性が示唆された。RNAウイルス出現に次いで出現するDNAウイルスについても、グラフに基づいた解析を実施したところ、DNAウイルス出現時にも海水の塩分濃度が大きく低下していることが分かっていた。さらに、RNAウイルスはDNAウイルスに比べて低水温の初夏に出現しやすいことも分かった。培養実験によると、RNA / DNAの両ウイルスはそれぞれ感染至適環境が異なっており、各ウイルスが出現しやすい条件は温度等に依存することが予想されている。これらの結果を総合的に考察すると、RNA / DNAウイルスの出現時期は温度に依存するものの、ウイルス感染が広がるためには急激な塩分の低下が必要であることが示唆された。本研究により、5年に亘る沿岸現場調査とデータの精査により、沿岸生態系における「珪藻・ウイルス・自然環境」の関係の一端を明らかにすることができた。一方で、既知のウイルス種とは全く異なる新奇ウイルスの出現も確認されており、我々の想像以上に珪藻-ウイルスの関係が複雑である事が示唆されてきた。今後は、*C. tenuissimus* と既知のウイルスのみならず、珪藻とウイルスの群集レベルの関係を解明する研究によって、現場海域における両者間の生態学的関係を明らかにしたい。

## P-238

## シロアリ腸内ファージメタゲノム解析と宿主腸内細菌の同定

○ 麩島 雄太<sup>1</sup>, 伊澤 和輝<sup>1</sup>, 河合 幹彦<sup>1</sup>, 桑原 宏和<sup>1</sup>, 雪 真弘<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>3</sup>, 本郷 裕一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>東工大・院生命理工, <sup>2</sup>理研 CSRS・BMEP, <sup>3</sup>理研 BRC・JCM

E-mail: mugishima.y.aa@m.titech.ac.jp

シロアリの高効率な木質分解能力の大部分は腸内微生物群集が担っている。その共生微生物群集はシロアリとシロアリに近縁なゴキブリのみに見られる特異な系統群で構成され、1.7 億年以上共進化してきたと推定されている。腸内微生物群集構造はシロアリ種内で高度に保存され、シロアリとの間で、また微生物種間で強固な共生関係を持つと考えられる。シロアリ腸内原生生物と原核生物の大多数は培養不能であるが、培養非依存的手法による詳細な研究が行われつつある一方で、ファージ（ウイルス）群集に関してはほとんど研究例がなかった。本研究では、シロアリ腸内ファージ群集構造の解明と各腸内細菌種に感染するファージの特定を目的とし、ファージを含むウイルスメタゲノム解析と、腸内細菌ゲノム上の CRISPR スペーサー配列に対応するファージゲノム断片の同定を試みた。CRISPR は多様な原核生物が持つ対外来 DNA 防衛機構で、CRISPR 領域には、侵入した外来 DNA の断片を取り込んだ 30 塩基程度の「スペーサー配列」が「リピート配列」に挟まれて数 10 から 100 本程度並んでいる。シロアリ腸液中のウイルス画分から DNA を抽出し、MiSeq を用いてメタゲノム配列データを取得、相同性検索などによりファージゲノム断片の同定を行った。一方、同シロアリ種の腸内原生生物が保有する細胞内共生細菌のゲノムを解読し、同ゲノム上に存在する CRISPR 領域のスペーサー配列とウイルスメタゲノムデータの照合を行った。その結果、多くのスペーサー配列が複数のファージ断片配列とほぼ一致した。これにより、シロアリ腸内では、原生生物細胞内共生細菌にもファージが感染し、それに対抗するために共生細菌が CRISPR/Cas システムを保持していることが明らかとなった。

## P-239

プロファージ遺伝子による *Paracoccus denitrificans* の MV 産生

○安田 まり奈<sup>1</sup>, 豊福 雅典<sup>2</sup>, 森永 花菜<sup>3</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大・生命環境学群, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系, <sup>3</sup>筑波大・生命環境科学研究科

微生物は自身の膜からメンブランベシクル (MV) と呼ばれるナノサイズの球状構造体を生産する。MV は核酸やタンパク質、細胞間シグナル物質を含有しており、それらの運搬体としての機能を有することから、実環境中において微生物間相互作用に重要な役割を担うと予想される。しかし、MV の形成機構については未解明な部分が多い。近年、我々は *Pseudomonas aeruginosa* において集団中の一部の細胞が破裂すること (explosive cell lysis, ECL) によって MV が形成されることを報告した (1)。この ECL を介する MV 形成はストレスによって誘導され、バクテリオファージによる溶菌機構に関わる遺伝子 *lys* および *hol* が必要となる。これらの遺伝子が多くの微生物ゲノム上のプロファージ領域に保存されていることから、ECL を介した MV 産生機構は微生物間で共通したものである可能性が示唆された。そこで我々は、*P. aeruginosa* 以外においても同様な機構で MV が形成されるかを確かめるために、土壌脱窒細菌である *Paracoccus denitrificans* を用いて解析を行った。

*P. denitrificans* においても、ストレス条件下で MV 生産が誘導されることが明らかとなり、さらにストレス応答因子である *recA* 欠損株では MV 生産の誘導は見られなかった。以上のことから、ECL と同様の機構による MV 生産が示唆された。さらに、当 MV に含まれる DNA の全ゲノムシーケンス解析により、プロファージ遺伝子が蓄積されていることが明らかとなった。興味深いことに、本プロファージは、推定 *lys* 遺伝子を保持していた。そこで、*lys* 遺伝子の破壊株を作成し、MV 生産を解析したところ、ストレスに応じた MV 生産の誘導は観察されなかった。以上より、*P. denitrificans* においてもストレス条件下での MV 産生にはプロファージ領域の *lys* が関与していることが明らかとなった。

先に述べたように、*lys* は多くの微生物のゲノムに保存されていることから、ストレス条件下における MV 形成の普遍的なメカニズムと考えられる。実環境中におけるファージの存在量を考えると、ファージと共に多くの MV が生産され、微生物間相互作用に関与していると考えられる。(1) Turnbull, Toyofuku, et. al. *Nat Commun.* (2016)

## P-240

海洋細菌ゲノム上でマクロライド耐性遺伝子 *mef(C)*-*mph(G)* を担う ICE の解析○杉本 侑大<sup>1</sup>, 丸山 史人<sup>2</sup>, 鈴木 聡<sup>1</sup><sup>1</sup>愛媛大・CMES, <sup>2</sup>京都大・医

E-mail: c641016k@mails.cc.ehime-u.ac.jp

【背景と目的】細菌は薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic resistance genes, ARGs) の獲得により耐性化することが知られている。さらに ARGs はプラスミドや Integrative conjugative element (ICE) などの可動性遺伝因子 (Mobile genetic element, MGE) 上に存在することも多く、細菌群集間で水平伝播する。愛媛県の養殖マダイ腸内から単離したエリスロマイシン耐性株 (6JANF4-E-4) は、新規マクロライド耐性遺伝子である *mef(C)*-*mph(G)* を保有し、かつ SXT R391 family ICE (SRI) type の MGE を持っていることがわかった。SRI は様々な ARG を運ぶため、疫学的観点からも重要な MGE であるが、過去にマクロライド耐性遺伝子を担ったという報告例はない。そのため、6JANF4-E-4 が保有する SRI は、既知のものと違う遺伝子カセットを有している可能性がある。本研究では、新規マクロライド耐性遺伝子を運ぶ遺伝子カセットを明らかにし、水圏環境中における MGE 間の組み換え機構の解明を目的とした。【結果と考察】 PacBio RS II を用いた次世代シーケンスにより得られたリードを HGAP3 によってアセンブルした結果、5 つのコンティグが得られた。16S rDNA の配列から、6JANF4-E-4 は *Shewanella halifaxensis* に近縁であることが明らかとなった。また、1 つのコンティグ上に、SRI の骨格領域が存在しており、これが *mef(C)*-*mph(G)* を担っていることが確認された。*mef(C)*-*mph(G)* の周辺には、*sul2* と *floR* の二種類の ARG が存在していた。さらにその外側には transposase が存在していた。この領域は、プラスミド pAQU1 上の *mef(C)*-*mph(G)* 周辺の類似する領域 (8705 bp) と、塩基配列で 98% の相同性を示した。6JANF4-E-4 が単離された現場海域では、過去に pAQU1-like のプラスミドが検出されていることから、*mef(C)*-*mph(G)* および周辺領域は、遺伝子カセットとして様々な MGE 間を組み換えによって移動していることが示唆された。【結論】 *mef(C)*-*mph(G)* を含む新規の遺伝子カセットは、様々な MGE 上に存在することが明らかとなった。これは ARGs が環境中に広く残存する機構の一つであると考えられる。



## P-241

### 飢餓状態の菌および貧栄養環境での遺伝子水平伝播

○香山 義明, 鈴木 聡

愛媛大・院農

E-mail: d653005a@mails.cc.ehime-u.ac.jp

[背景と目的] 薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) は、水平伝播 (Horizontal Gene Transfer, HGT) によって細菌群集中で拡散する。同じ ARGs が世界中に広く分布している事例や、ヒトの病原菌と海洋細菌に同じ ARGs が見つかることなどは、HGT が人獣病原体と海洋細菌の間で起こっていることを示唆する。しかし、海水中に存在する ARGs が人間生活圏へ侵入するリスクは不明である。今までは、HGT の研究のほとんどは、富栄養条件下で生育させた中温細菌で研究されてきた。海洋の場合は有機物濃度が低い貧栄養環境であるが、このような環境での HGT については報告の例は少ない。海洋環境からの ARGs 暴露リスクの評価には、貧栄養条件下での HGT 実態を知る必要がある。本研究では飢餓細菌および貧栄養条件下での HGT 頻度を定量することを目的とした。[方法] ARGs の供与菌 (D or d) には海洋由来の *Photobacterium* 株を、受容菌 (R or r) には大腸菌株を用いた。細菌を飢餓状態にするために、滅菌した人工海水または PBS に細胞を懸濁し、供与菌、受容菌をそれぞれ 25℃ および 37℃ で 6 日間放置した。この飢餓細菌 (d or r) と、富栄養条件下で培養した細菌 (D or R) との間でフィルターメイティング法を用いて、有機物が豊富な MB 培地 (富栄養環境) と有機物を含まない PBS 培地 (貧栄養環境) の二つの環境下で HGT を行わせ、その頻度を比較した。ARGs を受け取った受容菌 transconjugant (TJ) は tetracycline 20  $\mu$ g/mL を含む LB 培地上に生育したコロニー数を測定し、tet(M) の伝達を PCR で確認した。[結果] 陽性対照区 D→R では、貧栄養環境下での伝達は富栄養環境下の伝達率の 77.4% と低い傾向がみられた。富栄養環境の d→r では 53.4% を示し、率は低下したが有機物栄養が豊富であれば飢餓菌どうしても HGT は起こることが明らかになった。また、富栄養環境下で d→R では D→R の約 12 倍伝達率が高かった。飢餓供与菌 (d) は有機物栄養を得ると、HGT 能を活性化するのかもしれない。以上から、HGT は外洋のような貧栄養環境よりは、養殖場付近や排水が流れ込むような有機物豊富な場所のほうが高率に起こりうると思われた。



## P-242

## カンキツかいよう病菌に感染する大型ファージ XacN1 のゲノム解析による特徴づけ

○吉川 元貴<sup>1</sup>, Blanc-Mathieu Romain<sup>1</sup>, 緒方 博之<sup>1</sup>, 山田 隆<sup>2</sup><sup>1</sup>京都大・化研・バイオインフォマティクスセンター, <sup>2</sup>広島大・院・先端物質科学研究科・分子生命機能科学専攻

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

ファージにより病原性細菌を制御する技術（ファージセラピー、ファージバイオコントロール）への関心が高まっている。農業分野でも化学農薬に代わる持続的サポート技術として開発が進んでいる。カンキツかいよう病は、カンキツ類における深刻な感染症の一つであり、果実、葉、枝などに発生する。感染すると、被害果実の商品価値が低下すると同時に、落葉や枝枯れが生じ、樹が衰弱する。従来の化学農薬（銅剤）は、環境汚染や残留農薬などが問題となっているため、安全な代替農薬・防御技術の開発が望まれている。XacN1は、カンキツかいよう病の病原菌 *Xanthomonas citri* (syn. *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *citri*) に高い特異性を示す天敵ファージであり、ファージバイオコントロールに有用であることが期待される。電子顕微鏡による観察で、XacN1は直径約140nmの正二十面体頭部と145nmの伸縮性尾部から成る、大きなmyovirus型粒子を示した。また、XacN1の二本鎖DNAゲノムは、約384kb (G + C = 50%) であり、これは、配列決定されたファージのゲノムの中で *Bacillus* phage G (497 kb) に次ぐ二番目の大きさである。本研究では、XacN1の特徴を明らかにすることを目的とし、ゲノム解析を行った。ORFの推定により、XacN1のゲノムは約590個のタンパク質遺伝子をコードすることが予測された。DNA複製系のタンパク質が多く見つかったほか、いくつかのタンパク質は宿主との特異的相互作用への関与が示唆された。さらに、構造タンパク質を用いた系統解析により、XacN1の進化的起源を推測した。また、ファージとしては非常に多い50個以上のtRNAをコードすることが予測された。XacN1のゲノムには末端に約65 kbの重複が存在しているが、tRNAは全てその配列部分にコードされていた。XacN1にコードされるtRNAは重複を含みつつも、配列決定されたファージの中では最も多い。本発表では、これまでの解析結果について報告する。

## P-243

## genomic-OTUを用いたメタゲノム解析による海洋ウイルスの季節変動

○綿井 博康<sup>1</sup>, 西村 陽介<sup>1</sup>, 山本 圭吾<sup>3</sup>, 五斗 進<sup>2</sup>, 緒方 博之<sup>2</sup>, 左子 芳彦<sup>1</sup>, 吉田 天士<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>京都大・化研, <sup>3</sup>大阪環農水研

E-mail: hrhsys@gmail.com

**【目的】** 多様な海洋微生物は、個々が生態系で異なる役割を担う。海洋微生物の大多数は未分離であるが、16 rRNAに基づく分子系統解析によりその多様性や動態に関する知見は集積されつつある。微生物ウイルスは、微生物を数で遥かに凌駕するが、ウイルスは共通遺伝子 (e.g. 16 rRNA) を欠くことから、その生態的な理解は進んでいない。近年の研究から我々は、海洋ウイルスメタゲノム (ビローム) から多数の完全長ゲノムを構築した。これらをゲノム類似度に基づく genomic-OTU (gOTU, 属相当) と呼ぶ系統群に分類し、ウイルスの推定属数を既知の2倍以上に拡充した。本研究はgOTUを用いて季節的なビロームの動態解析を行い、ウイルス系統の生態的知見を得ることを目的とした。

**【方法】** 大阪湾と紀伊水道の海水試料を0.2  $\mu$ mで分画後、鉄共沈法と密度勾配遠心法でウイルスを精製し、MiSeqを用いて8つのビローム (2014年8月~2016年3月) 配列を得た。配列のアセンブリで得た10 Kbp以上のコンティグ (ゲノム断片) を、我々がこれまでに明らかにした1087 gOTUに分類した。ビローム配列のマッピングからウイルス頻度 (FPKM) を算出し、gOTUごとの定量的な動態解析を行った。

**【結果と考察】** 8つのビローム配列から得た3509コンティグの80%がgOTU (計480) に分類された。このことはrRNAの代替としてゲノム単位で海洋ウイルス群集の特徴付けが可能であることを示す。一方で、残りの20%のコンティグは、既存のgOTUに分類されない新規なウイルス系統であった。また夏季に採取した5つのビロームの群集組成は、他の季節の群集組成に比べ互いに類似していることから、その季節的変動が示唆された。次にgOTUごとの出現パターンを調べたところ、57 gOTUはそれぞれ特定の1つのビロームで高頻度 ( $\geq 10$  FPKM) であった。一方、10 gOTUは季節の異なる6つ以上のビロームで高頻度に出現した。ウイルスが宿主特異的 (時として株レベル) に代謝系を利用して増殖することを考慮すると、こうしたgOTUの長期的な出現パターンの相違は、宿主の個体群レベルでの消長や代謝の差異に起因すると推察される。今後、本手法を用いた動態解析により、各季節の微生物にウイルスが及ぼす影響を把握することは、微生物が支える海洋生態系が温暖化に伴う水温上昇で、どう変遷するかの予測をもたらすため、非常に重要だと考えている。本研究はキャノン財団「理想の追求」の助成を受けた。

## P-244

# Heterosigma akashiwo virus 配列解析と Phycodnaviridae 再定義

○植木 尚子

岡山大・植物研

E-mail: shokoueki@okayama-u.ac.jp

近年、300 kbp~ 2 Mbp という広範囲なサイズにわたる二本鎖DNAをゲノムとする大型二本鎖DNAウイルス (Giant dsDNA virus, 以下G-DNAV) が次々と単離・同定されている。G-DNAVは、300 kb~1.2 Mbと、ウイルスとしては巨大なdsDNAをゲノムとする。ゲノム上には数百のORFと共に、長い遺伝子間領域、複数のtRNAコード領域等、新奇な特徴が見られる。例えば、共生微生物カルソネラは、既知細胞性生物で最小サイズのゲノム— 約160 kb、ORF数182 —を持つことを考えると、G-DNAVは、ほとんど細胞生物並みの複雑さをもったウイルスと言える。私たちは、G-DNAVの一つである *Heterosigma akashiwo virus* (*HaV*) のゲノム全長配列を解読し、解析を行った。G-DNAVに属するウイルスは非常に多様性に富むが、その一つのfamilyとして *Phycodnaviridae* が挙げられる。*Phyco* =藻類に感染するdsDNAウイルスはこれまで *Phycodnaviridae* として分類されてきたものであり、赤潮原因藻 *Heterosigma akashiwo* に感染する *HaV* も *Phycodnaviridae* とされてきた。一方で、近年同定された幾つかの藻類dsDNAウイルスには、それまでに *Phycodnaviridae* とされてきたものとは非常に異なる性質を持つものが多く、*Phycodnaviridae* の再分類・再定義を促す声が上がっている。*HaV* ゲノムの解析により、*HaV* は、これまでのいわゆる「古典的な」*Phycodnaviridae* とも、その後に単離・同定された他のウイルスファミリーとより似た *Phycodnaviridae* とも、保有する遺伝子の多くの相同性が低いウイルスであることが明らかになった。この結果は、*HaV* が他の *Phycodnaviridae* メンバーとは独立したグループであることを示唆する。また、この解析を行う過程で *HaV* 以外の、他の *Phycodnaviridae* の分類についての知見を得た。ポスターでは、これらの詳細について発表する。

## P-245

## プラスミドを持つ宿主の fitness (適応度) を増加させる原因因子の同定

○片岡 大亮<sup>1</sup>, レー ティー タントウ<sup>1</sup>, 道羅 英夫<sup>2</sup>, 金原 和秀<sup>1</sup>, 新谷 政己<sup>1</sup>

<sup>1</sup>静大院・総合科技・工, <sup>2</sup>静大・グリーン研

E-mail: kataoka.taisuke.15@shizuoka.ac.jp

【目的】プラスミドは種々の微生物間を接合伝達により伝播可能な遺伝子の運び手であり、微生物の急速な進化・環境適応に寄与すると考えられている。分子生物学の必須のツールとして用いられている一方、薬剤耐性遺伝子を伝播する媒体として問題視されている。宿主はプラスミドを保持する事で様々な影響を受けるが、選択圧のかからない条件下では宿主の fitness (適応度) を低下させる場合が多い。我々は、IncP-1 群に属するプラスミド pBP136 を保持する、*Pseudomonas putida* mt-2 株の派生株、KT2440 株及び PpY101 株の 2 株について fitness の変化を比較したところ、KT2440 株では低下し、PpY101 株では向上するという全く逆の現象を見出した。本現象は、この結果から、PpY101 株にはプラスミドを持つ際に fitness を向上させる原因因子が存在すると推定された。そこで本研究では、プラスミドと宿主の関係性を理解することを目的とし、各菌株を全ゲノム配列レベルで比較し、この違いをもたらす原因について、より詳細に調べることにした。

【方法】KT2440 株と PpY101 株の全 DNA を抽出後、MiSeq (Illumina 社) にてショットガンゲノムシーケンスを実施し、各菌株のドラフトゲノムシーケンスを得た。得られた配列と、既にデータベースに登録されている参照配列 (NCBI Accession no. NC\_002947, Nelson et al., 2002, Environ. Microbiol. 4:799) との比較を、large-scale blast score ratio (LS-BSR) によって行い、各菌株間の遺伝子の有無と Similarity について調べた。PpY101 株で欠落が認められた領域について、欠落させた KT2440 株の欠損変異株を作出し、本欠損株を用いて、pBP136 を保持する場合と保持しない場合についての競合試験を行った。

【結果と考察】2 菌株のゲノム配列を LS-BSR によって比較し、PCR により検証したところ、PpY101 株は、KT2440 株の推定外来遺伝子領域、GI-50 (genomic island-50) 領域の一部、約 55 kb を相同組換えによって欠損していることが示唆された。そこで、KT2440 株から当該領域を除いた欠損株を作出し、pBP136 を伝達させて、プラスミド保持株と非保持株とで競合試験を行った。その結果、プラスミドを保持する欠損株では、もとの KT2440 株に比べて fitness の低下が解消されたことから、本領域にプラスミドの宿主の fitness を低下させる因子が存在されることが示唆された。現在は、本欠損株が他のプラスミドをもつ場合についても調べている。



## P-246

### 放線菌由来ウイルス様粒子による広宿主域水平遺伝子伝播

○鈴木 誠治<sup>1</sup>, 于 飛<sup>1</sup>, 今田 千秋<sup>1</sup>, 千浦 博<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京海洋大・院, <sup>2</sup>東京大・大気海洋研

E-mail: sesuzuki@kaiyodai.ac.jp

近年の急速な遺伝子解析技術の進展は、生物ゲノム構造を俯瞰し進化の道筋を遺伝子レベルで知ることを可能にしたが、ドメイン（真正細菌、古細菌、真核生物）を越えた遺伝子伝搬は如何に行われてきたのだろうか。従来の形質転換、接合、形質導入などのHGT概念はその説明には不備と考え、『広宿主域な遺伝子伝達粒子(Vector Particle: VP)』という新たな粒子に着目し、それが系統的に遠い種に遺伝子伝達能を持つことを報告してきた。

VPは電顕確認を要するが、形質導入体から同様の性格を持つ娘粒子を出芽生産し連続形質導入を行う。

1,4-ジオキサソ(DO)を唯一の炭素源として資化する放線菌*Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190株(JCM13855)を27°Cでグルコース、DO添加アンモニウム無機塩培地(Parales et al., AEM. 1994 60:4527-30)で定常期まで培養(3.0E+08 cells/mL)した0.22 μmろ過上清に1.9E+09 particles/mLのSYBR Gold 染色性ウイルス様粒子(CB\_VLPs)生産を、放線菌から初めて認めた。VLPは長卵、垂球、不定形を採り、径50~300 nmに分布し100 nmを超えるものが7割超で、可搬dsDNAはColi Phage T4基準で28.8 Kbp~5.4 Mbpとなる。CB\_VLPsの遺伝子伝達能を検討するため、栄養要求性突然変異株*Escherichia coli* AB1157[F; *thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 proA2 his-4 argE3 rpsL31 tsx-33 supE44*]に多重感染度0.7~20(27°C, 30')で感染させ、受容菌致死効果(EOP)とアミノ酸要求性復帰を指標として検討の結果、致死効果は観測されず、選択標識に復帰形質導入株が7.2E-07 CFU/VLPの頻度で生じ、*arg*標識で選択された全て(53 CFU)が非選択標識*his*に対して完全な連鎖を示した。因みにCB1190ゲノムでの*arg-his*標識間距離は27 kbpである。このようにCB\_VLPは系統的に門を超えるHGTが可能であり、VPとして生物環境適応と多様性創出とに寄与しているだろう。



## P-247

### 超好熱古細菌 *Pyrobaculum* 属に感染する新規ウイルス 2 種の分離

○望月 智弘<sup>1,2</sup>, 布浦 拓郎<sup>2</sup>, 吉田-高島 ゆかり<sup>2</sup>, 高木 善弘<sup>2</sup>, 高井 研<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東工大・地球生命研 (ELSI), <sup>2</sup>JAMSTEC

E-mail: tomo.mochiviridae@elsi.jp

地球上には細胞性微生物の 10 倍以上のウイルスが存在していると言われている。我々のウイルス多様性に関する知識は、医学・農学系に関わる病原性真核ウイルスと、極一部の原核ウイルス(ファージ)が中心となっている。真核生物と真正細菌に感染するウイルスはこれまでに数千種以上分離されているのに対し、生物界第三のドメインと言われる古細菌(アーキア)に感染するウイルスは僅か 100 株ほどが分離されているに過ぎない。しかしながら古細菌ウイルスには、レモン型・ボトル型・バネ型など実に奇妙な形状を有するものをはじめ、同じ原核生物である真正細菌ウイルス(ファージ)と比較しても圧倒的な形状多様性を有し、独自のウイルス叢(virosphere)を構成していることが示されている。超好熱古細菌 *Pyrobaculum* 属は世界各地の陸上温泉から分離されているものの、これまで本属に感染するウイルスは、イエローストーン国立 (YNP)(米) とイタリアから 2 種分離されているのみであった。本研究では、温泉試料より 90℃ で増殖する *Pyrobaculum* sp. の超好熱古細菌、並びにそれに感染する球形とフィラメント状のウイルス 2 種を分離し、球形のものを *Pyrobaculum* spherical virus 2 (PSV2)、フィラメント状のものを *Pyrobaculum* filamentous virus 2 (PFV2) と命名した。球形の PSV2 は約 20 kbp の二本鎖 DNA ゲノムを有し、YNP から分離され同じく *Pyrobaculum* sp. に感染する PSV (*Globuloviridae* 科) の近縁種であった。フィラメント状の PFV2 は約 16 kbp の二本鎖 DNA ゲノムを有し、YNP 環境サンプル由来の集積培養産物のメタゲノム解析から見いだされた HAV1 と近縁種であった。HAV1 は分離株としては得られておらず、本研究により得られた PFV2 が初の分離株であり、本ウイルスはウイルス分類学上の新科に属することが明らかとなった。

## P-248

## イプシロンプロテオバクテリアが産生する細胞外膜小胞の形態学的・遺伝学的特徴

○吉田 ゆかり, 吉田 光宏, 西 真郎, 高木 善弘, 高井 研

海研機構

E-mail: yukariyo@jamstec.go.jp

細菌は恒常的に自身の細胞外に小型の膜小胞 (outer membrane vesicle) を分泌する。細胞外膜小胞は、シグナル情報伝達などの細胞間コミュニケーションとしての機能だけでなく、遺伝情報物質の細胞間輸送にも関与しており、新たな遺伝子伝播因子としての可能性が注目されている。しかしながら、初期生命誕生の場と考えられている熱水生態系において、細胞外膜小胞の生態学的・進化的機能に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、熱水生態系を代表する生物モデルとして、多様なエネルギー代謝経路を持ち、ダイナミックな熱水環境に適応したイプシロンプロテオバクテリア綱の化学合成独立栄養細菌を用いて、細胞外膜小胞の形態学的観察および内包される遺伝情報の網羅的機能解析を行った。熱水活動域から採取した様々な試料から単離したイプシロンプロテオバクテリアのうち、既にゲノム配列が明らかとなっている6株の単離菌株を用いた。これらの培養液を孔径0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過後、ろ液を超遠心により濃縮し、Optiprepを用いた密度勾配遠心により細胞外膜小胞画分を精製した。各画分をネガティブ染色後、電子顕微鏡下で観察し、細胞外膜小胞の産生能の有無および、産生能が認められた株について、細胞外膜小胞の形態学的特徴を調べた。その結果、産生量に違いがあるものの、いずれの株においても約20nm ~ 100nmの細胞外膜小胞が観察された。また、*Nitratiruptor* sp. YY08-13およびYY08-26では、*Thermococcus*などで見られるNanotubeやNanopodと呼ばれる構造体に非常によく似た細胞外膜小胞を産生することが明らかとなった。現在、これらの細胞外膜小胞に内包される遺伝情報について解析を進めている。

## P-249

## 一本鎖DNAウイルス群を標的とする定量的メタゲノミクス

○吉田 光宏<sup>1</sup>, 望月 智弘<sup>2</sup>, 浦山 俊一<sup>1</sup>, 吉田(高島) ゆかり<sup>1</sup>, 西 真郎<sup>1</sup>, 高木 善弘<sup>1</sup>, 布浦 拓郎<sup>1</sup>, 高井 研<sup>1</sup>

<sup>1</sup>海洋機構, <sup>2</sup>東工大ELSI

E-mail: mityoshi@jamstec.go.jp

環境中のウイルスは、宿主バイオマスの動態制御や炭素循環の駆動、遺伝子水平伝播に関わる因子として、微生物生態系において重要な役割を担っている。海洋におけるウイルス群集は、単離ウイルスなどの知見から主に二本鎖DNAタイプで構成されると考えられている。その一方で、演者らは最近、深海堆積物表層部のウイルスメタゲノム調査から、取得した配列の多くが一本鎖DNAウイルスに由来することを見出している。しかしながら、phi29 DNAポリメラーゼを用いたウイルスメタゲノム試料の増幅過程において、環状の一本鎖DNAへの増幅バイアスが生じることから、得られた結果に対して一本鎖DNAウイルスの存在量を過大評価し、正確に定量できていない可能性が考えられる。そこでこの欠点を改善するため、一本鎖タイプと二本鎖タイプのウイルス群集を定量するための新たなメタゲノミクスアプローチを考案し、東北沖(500m以深)表層堆積物サンプルに対して本アプローチを実践した。サンプルから抽出したトータルウイルスDNAより、一本鎖DNAと二本鎖DNAを回収した後、それぞれメタゲノム解析を行った。その結果、一本鎖DNAウイルスメタゲノムにおいて一本鎖DNAウイルス(Microviridae科ファージやCircoviridae科ウイルスなど)が多くを占める一方、二本鎖DNAウイルスメタゲノムからは二本鎖DNAウイルス(おもにCaudovirales目に属する典型ファージ)が多くを占めることを確認した。このように、両者のメタゲノムは異なっており、それぞれのウイルス群集像を個別に明確化することが可能であった。次に、両タイプのウイルス核酸量を定量し、ウイルス1粒子に含まれるDNA量の情報をもとにウイルス量を算出した。二本鎖DNAウイルス量の値は、本タイプを主なターゲットとした直接計数の値とほぼ類似しており、妥当な結果が得られた。一本鎖DNAウイルス量については、これらの値をはるかに上回る量が認められ、100倍から1000倍も多いことが判明した。以上、本アプローチを行うことにより、両群集のウイルス量と組成についてバイアスの影響を回避したデータの収集が可能となった。さらに、DNAウイルス群集内において99%以上もの数を占める一本鎖DNAウイルスの存在が明らかとなり、本ウイルスタイプが深海堆積物表層環境下で優占していることが強く示唆された。

## シンポジウム出張ポスター発表

### P-S2

Ecology of *Campylobacter* and *Arcobacter* pathogens in a freshwater lake environment

Mayumi Kobayashi<sup>1</sup>, Qian Zhang<sup>2</sup>, Mitsuto Maeda<sup>1</sup>, Akiho Miyamura<sup>1</sup>, Takahiro Segawa<sup>3</sup>, Satoshi Okabe<sup>1</sup>, Satoshi Ishii<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

<sup>2</sup>Department of Soil, Water, and Climate; and BioTechnology Institute, University of Minnesota

<sup>3</sup>Center for Life Science Research, Yamanashi University

*Campylobacter* species are the most common foodborne bacterial pathogens. Similar to *Campylobacter* pathogens, some members of the genus *Arcobacter*, which is phylogenetically closely related to the genus *Campylobacter*, can also cause human diseases. While the main source of the *Campylobacter* infection is the consumption of contaminated water and foods, sources of *Arcobacter* infection are largely unclear. The objectives of this study were to (1) quantitatively detect *Campylobacter* and *Arcobacter* in a natural freshwater lake and (2) identify their sources. Water samples were collected from Lake Miyajimanuma in Hokkaido, Japan, monthly from April 2013 to November 2014. Tens of thousands of geese use this lake as their stopover site during their migration in spring and fall. Lake water is used for irrigation in the surrounding agricultural area; therefore, fecal pollution by these geese is of concern. Based on the 16S rRNA gene amplicon sequencing, microfluidic pathogen-specific qPCR, and culture-based pathogen isolation methods, we detected high level of *Campylobacter* in the lake water, especially during geese migration seasons. We also detected *Campylobacter* in the geese fecal samples. In addition, identical *flaA* sequences were detected from water and geese samples by *flaA* amplicon sequencing. These results suggest that migratory geese are the major source of *Campylobacter* pathogens in the lake. In contrast, *Arcobacter* was detected in the lake water in summer months, during which no goose was observed. *Arcobacter* was not detected from geese fecal samples. Based on the *flaA* amplicon sequencing, identical *Arcobacter* genotype appeared over time, suggesting that *Arcobacter* may be present as part of the indigenous microbial flora in the lake environment. In conclusion, our results suggest that occurrences of *Campylobacter* spp. in the lake water were most likely related to the migration of geese; while *Arcobacter* spp. might be naturally present in the environment.

## P-S2-1

### Phytase-producing bacteria from Chilean hydrothermal environments

Stefanie Gabler<sup>1</sup>, Nitza Inostroza<sup>2</sup>, Jacqueline Acuña<sup>2</sup>, Daniel Menezes-Blackburn<sup>3</sup>, Ralf Greiner<sup>1</sup> and Milko Jorquera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and food, Karlsruhe, Germany

<sup>2</sup>Scientific and Technological Bio-resource Nucleus, Universidad de La Frontera, Ave. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile

<sup>3</sup>Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, UK.

Email: milko.jorquera@ufrontera.cl +56 45 232 5467

Phytases are ecologically important enzymes involved in the organic phosphorus cycling in nature. These enzymes are widely used as feed additives to improve mineral bioavailability in animal diets. For their biotechnological application, thermal tolerance is, among others, a desired property of phytases. However, so far thermal tolerance has scarcely been included into phytase-screening programs. The objective of this study was isolate and characterize thermo-tolerant bacterial phytases from Chilean hydrothermal environments. Screening of 69 thermo-tolerant (60°C) culturable bacteria was carried out and the strains *Bacillus* sp. 9B and *Geobacillus* sp. 15 were selected and identified (16S rRNA gene) as producers for intra- and extracellular phytases. The results also indicate that both strains are able to synthesize more than one individual phytase. The characterization of intracellular phytase revealed that *Bacillus* sp. 9B produces phytase that shows an optimum pH at 5.0. This result suggests a novel property for phytases from genus *Bacillus* which are mostly characterized by  $\beta$ -propeller phytases with optimal pH in the range of 6.5 to 8.0. The strain *Geobacillus* sp. 15 also produces phytase that shows optimum pH at 5.0, but with an unusual residual activity at low pH (12% and 30% at pH 1.0 and 4.0, respectively). The temperature optimum for phytate dephosphorylation was determined to be 60°C for the phytase from *Bacillus* sp. 9B and 50°C for the *Geobacillus* sp. 15 phytase. Interestingly, the phytase from *Geobacillus* sp. 15 shows a residual activity of 46% after incubation at 90°C for 20 min. Our study demonstrates that Chilean hydrothermal environments represent an unexplored source of novel thermo-tolerant bacterial phytases with more favorable properties for biotechnological applications, for example in food processing or as feed additives.



## 高校生ポスター発表

### H-01

#### 「ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)の走光性」

中谷 樹莉奈、松原 優希奈、鈴木 ひかり、関鵬洋 (神奈川県立横須賀高等学校)

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、その細胞内にクロレラが共生しており、走光性を示す。本研究では発光ダイオード(LED)により、培養液中のミドリゾウリムシに光を照射し、その走光性の波長と強度による変化を考察する。また、ワンボードコンピュータであるRaspberryPiの汎用入出力(GPIO)をプログラム言語pythonにより制御してLEDを一定の周期で明滅させ、その明滅パターンがミドリゾウリムシの走光性に与える影響を考察する。

ミドリゾウリムシを暗所で培養して共生クロレラの個数を減少させた白化ミドリゾウリムシについても同様の実験を行い、共生クロレラがミドリゾウリムシの走行性に与える影響を考察する。

これらの実験において走光性の記録には自作の簡易顕微鏡による拡大撮影データを使用する。撮影したデータを元にミドリゾウリムシの培養液中における軌跡のデータ処理を行う。

### H-02

#### 「イカから採取した発光バクテリアの培養」

○金子 大輔、花房 若菜、相川 宏輝、清水 耕太郎、□橋本 明人、渡邊 俊樹、江波戸 達也、内構 里菜、□高野 優香、坂上 欧介、森住 太一 (横須賀学院高等学校)

私達は昨年「イカの体表に生息している発光細菌の培養」について研究を進めてきた。

昨年度は入手した資料に基づき実施したにも関わらず、増殖、単離には至らなかったため、今年度は次のように作業工程を見直し、増殖を目指した。

スーパー等で新鮮な活イカを購入し、外套膜を適当な大きさに切る。

切ったイカをシャーレに入れ、イカにかからないよう注意しながら3%食塩水を注ぐ。

シャーレにふたをして、さらにジップロックに入れたものを17□に設定したインキュベータに入れ、24~48時間静置したのち、暗箱に入れ、発光を確認。

しかし、この方法では発光を確認できなかったため、別の文献の著者である慶應大学の秋山豊子氏に照会し、助言に従って、デジタルカメラを用いて長時間露光で撮影したところ、幾つかの試料から発光を確認でき、24時間培養したものより48時間培養したものの方が発光面積も広く、より明るかった。次に、発光している部分をマリンスロス寒天培地に移し、24~48時間培養させ、発光微生物の単離を試みた。しかし、切り身を直接培養したときよりも発光が弱く、日に追うごとに減衰していった。そのため、培地にイカ抽出液を加えるなど培養条件についての試行錯誤を重ねている。今後はイカ体表の微細観察に加え、発光が微生物本体によるものか、微生物由来の発光物質によるものかを検討し、どのような条件で一番長く、明るく発光するのかに焦点を当てて研究を進めていきたい。

また、この実験では、イカの外殻の切り身と同時に作製したイカの眼球およびその周囲の筋肉組織を用いたシャーレのほうが明るく発光していることに気づいた。その理由として、流通の過程で魚体が流水で洗われる際に、イカの体表よりも構造が複雑な眼球周辺に発光細菌が多く残されているのではないかという仮説と、イカの眼球周辺には、発光細菌の発光を促進する液体が分泌されているのではという仮説を立てている。

### H-03

#### 「イシクラゲを喰らう」

○桐畑 誠、阿部 望夢（神奈川県立平塚農業高等学校）

##### 「目的」

イシクラゲは、古来沖縄地方で食用に供していたラン藻類の一種で、現在ではシアノバクテリアと呼ばれている。しかし、最近では道路・庭・または駐車場に生えていてむしろ邪魔な存在になっている。どのようにしたら食用に供することができるのかを検討した。また、イシクラゲの中に入っているカロテノイド色素について分析をして、総合的にイシクラゲについて知ることを目的に行った。

##### 「方法」

材料のイシクラゲは、平塚市内の駐車場などから採取したものをそのままビニール袋に入れて学校に持ち帰った。綺麗に洗って（ごみや小石を取り除く）沸騰した水に5分間加えて煮沸消毒した後、ざるにとってから水道水にさらし、粗熱を取って再度ざるにあけて試食に供した。

そのまま利用した組み合わせは、ポン酢・三杯酢・みそ汁・そばつゆ・中華スープ・ドレッシング・食べるラー油・お茶づけなどである。少し手を加えて加工したものに、ふりかけ・板のり・佃煮。料理に加えてみた例は、かき揚げ・チジミ・卵焼きです。

色素の分析には、イシクラゲをヘキサン：アセトン（7：3）混液にて抽出してからシリカゲルTLCによる分離後、画分を以下の実験に用いた。分光光度計での吸収波長・HPLC（シムパックCLC-ODSカラム アセトニトリル）

##### 「結果」

イシクラゲの食感を生かせる料理もあるが、相当工夫しなければ食べさせそうにないものもあった。イシクラゲの黄色みがかかった赤色の色素はエキネノンであることがわかった。エキネノンはビタミンAの効果を持つ。一般的な食材としては、ウニの中の色素として有名である。

さらに、研究班の活動としてアルカリ性の土壌にシアノバクテリアを繁殖させて野菜等を栽培するピロール農法の検証実験も開始した。

### H-04

#### 「ミドリムシの利用に関する研究」

○飯田 龍揮、村上 睦、山口 未矩、□湯川 真尋、西村 月夕海、  
中野 裕理（神奈川県立平塚農業高等学校□）

##### 「目的」

以前卒業した先輩方が行っていたミドリムシの培養方法の検討と培養したミドリムシを使った食品開発でクッキーやロールケーキ、マシュマロ等を作りました。このことをふまえて今回はクッキーなどのお菓子という点ではなく普段の生活に取り入れやすい主食というところに注目し、ミドリムシを日常的に摂取できるようにすることを目的に製造実習を行った。

### 「方法」

培養したミドリムシは国立環境研究所から分譲していただいた N I E S—48 を H U T 培地に植えつき、窓辺に約 20 日間おいて緑色になったものを遠心分離 (6000 r p m×5 分間) した沈殿物を試料とした。実験区は、ミドリムシの入っていないパン、市販のミドリムシ粉末を入れたパン、自分たちで培養したミドリムシ入りパンの 3 種類を製造して、比較検討した。

### 「結果」

製造したパンは、第一に、ミドリムシを混ぜるタイミングの検討として当初より生地に練りこむ方法が発酵後に混ぜるより適していることがわかった。第二に、生地を焼く温度は指定されている 220℃ではなく、180℃の方が適していることがわかった。

さらに本来のパンには含まれていない、ミドリムシの成分が我々の健康促進効果が期待される。また、本校の記念庭園中の池の中にもミドリムシが生育していることが判明したり、同じ研究班のイシクラゲ観察中に偶然にもミドリムシを発見した。土壌中に存在していることがわかったのでその生育調査も今後続けていければと感じている。

## H-05

### 「廃材を用いたキノコ作り」

□○川上 和真、松山 大晟、内海 碩人、小石原 祐介 (神奈川県立平塚農業高等学校)

### 「目的」

サンゴ樹という学校で使用されていた防風林が廃材として捨てられそうになるのを見かねた先輩が「この木がこのまま捨てられるのはもったいない、この木でキノコを作れないか」という気持ちから、きくらげ作りに挑戦した。次の年、新しいテーマとして「サンゴ樹ではない、身近な廃材を利用してキノコを作れないか」という事で、とても身近であり、多く捨てられる段ボールを使ったヒラタケ作りを行った。

そして今年、課題になっていたダンボールの役割の解明と「身近にある廃材を、種類を増やして作る」ということで、段ボールだけではなく職員室で出たシュレッダー紙を利用したヒラタケつくり挑戦し、多くの人に廃材でも十分にキノコ作りができることを知ってもらうことを目的にした。

### 「方法」

培地は、米ぬか+廃材+水だけの簡単なものです。専用の P P 袋に詰めて、121℃2 気圧 70 分間オートクレーブして滅菌した。放冷後 クリーンベンチ内で袋を切り、種菌を植えて、上部を加熱シールし室温にて培養した。もう一つの課題であったダンボールの役割として、菌を植えた培地 (いわゆる菌床培地) 中のグルコース濃度の測定を H P L C (シムパック C L C—NH2 水 示差屈折計) を用いて行った。

### 「結果」

結果は予想通り廃材の種類に関係なく、ヒラタケを収穫することができた。ヒラタケの収穫量に、段ボールとシュレッダー紙では有意な差は見られなかった。収穫したヒラタケは、研究班の生徒で、バター醤油炒めでおいしくいただきました。

菌床培地中のグルコースはほとんどが、米ぬか由来のものであることが判明した。また、シュレッター紙はほとんどグルコースを産生することがなかったが、段ボールは、グルコース産生力が強かった。これにより段ボールは菌の生育環境と栄養素の両方の意義が示唆された。高価なオガコの代わりとして、安価な段ボールやシュレッター紙を用いることによってキノコを生産することが可能になった。これは大きな成果である。

## H-06

### 「除菌スプレーと合成洗剤の食中毒菌におよぼす除菌効果」

中島 彩香、北堀 隼人（山村学園山村国際高等学校）

【背景】生物部の研究テーマは微生物(真正細菌)を対象としている。ここ数年は抗菌力をもつ天然食材の抗菌効果の研究を行っている。これらの研究により、天然食材に含まれる抗菌成分や、その分量と抗菌効果の関係を検証することができた。昨年の研究は、テレビのコマーシャルで良く目にする除菌スプレーや台所用合成洗剤には「99.9%」の除菌とあるが、これは本当なのか!?この疑問から納豆菌を試験菌株として検証を行ったが、納豆菌なので説得力を欠いた。そこで今回、食中毒菌(大腸菌)を試験菌株としてブラッシュアップを図り、「99.9%」の高い除菌効果は存在しないと考え(仮説) 検証を開始した。

【材料および方法】研究には予備実験(抗菌力試験)の結果から、除菌スプレーには「ファブリーズ」、台所用合成洗剤には「ジョイ」を選んだ。除菌スプレーの除菌効果は、生菌(グラム陽性菌の大腸菌)を付着させた布巾に「ファブリーズ」を噴霧して、除菌されなかった生菌を希釈法にて生菌総数(CFU/g)として比較した。また「ファブリーズ」以外に、太陽光と殺菌灯を照射した布巾も、同様に希釈法にて生菌総数を比較した。一方、台所用合成洗剤の除菌効果は、生菌を付着させた布巾に「ジョイ」を十分浸透させ、一晚浸け置いた後、これも希釈法にて生菌総数として比較した。さらに台所用合成洗剤の「ジョイ」に、抗菌効果の高いレモングラス(天然精油)を5.0%・10.0%・20.0%添加して、この除菌力の強化を試みた。

【結果および考察】「ファブリーズ」の生菌(大腸菌)におよぼす除菌効果は低く(49.5%)、「99.9%」の除菌効果は無かった。一方、太陽光(98.4%)や殺菌灯(100.0%)では高い除菌効果が発揮され、除菌スプレーの化学物質による除菌効果より有効性が検証できた。また「ジョイ」の場合は、一晚浸け置くことにより布巾の生菌(大腸菌)は大幅に減少(94.7%)したが、これも「99.9%」の除菌効果は無かった。しかし「ジョイ」に、レモングラスを添加していくと、20.0%で除菌効果が強化(約3.1倍)された。これはレモングラスの抗菌成分であるシトラールによるものと考察した。このレモングラスの添加は、台所用の強力除菌合成洗剤(特製ジョイ)の使用法として提案したい。

## H-07

### 「ミントタブレットの口腔細菌におよぼす抗菌効果」

小林 湧弥（山村学園山村国際高等学校）

【背景】生物部の研究テーマは微生物(真正細菌)を使用した抗菌力をもつ天然食材の抗菌効果である。昨年は納豆菌をマーカーとして、『ミントタブレットの抗菌効果』を研究し、ペパーミントによるメントールの抗菌効果を発表した。今回はマーカーを納豆菌から口腔細菌(以下、口腔菌)に替え、ミント錠菓である「ミントタブレット」にも口腔菌におよぼす抗菌効果があると考え(仮説)、その原因を検証した。

【材料および方法】ミント錠菓である「ミントタブレット」には多くの種類があるが、今回は「ミンティア(アサヒフード&ヘルスケア)」を検体として選んだ。内訳は「コールドスマッシュ」・「ドライハード」・「ワイルド&クール」・「グレープ」・「ピーチレモンソルベ」・「アクアスパーク」・「カルピス×ミンティア」・「黄金桃」・「グレフルアロマミント」・「カテキンミント」・「グリーンエバー」の11種類である。抗菌効果の測定には、口腔菌を標準寒天培地(以下、培地)に全面塗布し、ここに「ミンティア」を等間隔に配置した。培養はインキュベータで36℃・18時間、好気条件下で実施した。培養後、口腔菌の増殖を阻害した阻止円範囲から抗菌効果を算出した。

【結果および考察】生物部員の官能試験(「ミンティア」を口に含む)の結果から、「ミンティア」には辛味と酸味と甘味の3タイプがあり、口腔菌におよぼす抗菌効果は、酸味>甘味≠辛味の順となった。そこで酸味の検証のため、各「ミンティア」のpHを測定すると、酸味タイプは他の2タイプと比較して酸性度(pH=2.86~2.96)がとても低く、これは酸味「ミンティア」であった。さらに、この酸味「ミンティア」を調べてみると、原材料として酸味料の記載があり、昨年の納豆菌による研究では、抗菌効果は辛味のペパーミントによる「メントール」の作用であると報告したが、口腔菌では酸味料による酸性度(pH)と考察した。その根拠としてはpHを調節した培地の検証において、口腔菌はpH=4.5では盛んに増殖するが、pH=4.0では全く増殖が見られない。すなわち酸味「ミンティア」は、酸味料によりpH≤2.96と酸性度が低いために、これが培地に浸透拡散してpH≤4.0の濃度勾配を作り、口腔菌の細胞膜(脂質二重層)を透過して高い抗菌効果を発揮したと考察した。

## H-08

### 「香辛料の食中毒原因菌におよぼす抗菌効果」

上坂 朋之(山村学園山村国際高等学校)

【背景】研究テーマは微生物(真正細菌)を使用した抗菌力をもつ天然食材の抗菌効果である。前回は納豆菌をマーカーとして、『加工香辛料の抗菌効果』を発表した。今回はマーカーを食中毒原因菌(以下、食中毒菌)に替え、さらに香辛料も加工品(チューブ入)と天然品(生食材)に種類を増やして、これらの香辛料が食中毒菌に抗菌効果があると考え(仮説)、その原因を検証した。

【材料および方法】香辛料は、加工品はエスビー食品の「本わさび・本からし・生にんにく・生しょうが」を選び、天然品は静岡産「山葵」・青森産「大蒜」・高知産「根生姜」を選んだ。マーカーはグラム陽性菌の「黄色ブドウ球菌・セレウス菌」と、グラム陰性菌の「大腸菌・腸炎ビブリオ」を選んだ。また天然品「山葵」に加工品「本わさび」を混ぜ、「山葵」の風味を活かした刺身の「腸炎ビブリオ」に抗菌効果の高いワサビの香辛料も研究した。抗菌効果の測定には、改良したペーパーディスク(以下、PD)拡散法に従い、希釈法で濃度調節(10<sup>7</sup> CFU/mL)した食中毒菌を万能寒天培地(以下、培地)に全面塗布し、中央



に香辛料を浸み込ませたPDを配置した。培養は36℃・18時間、好気条件で行った。培養後、食中毒菌の増殖を阻害した阻止円範囲を基準として、抗菌効果を表した。

【結果および考察】「本わさび・本からし」は、全ての食中毒菌に高い抗菌効果をおよぼした。特に「腸炎ビブリオ」の阻止円範囲は最大であった。また「山葵」では「腸炎ビブリオ・セレウス菌」で抗菌効果が認められた。これらは揮発性のアリルイソチオシアネートとよばれる辛味の抗菌成分により抗菌効果を発揮している。一方「生にんにく」は、「セレウス菌」に若干の抗菌効果があったが、「大蒜」では、全ての食中毒菌に抗菌効果をおよぼした。これらも揮発性のアリシンとよばれる臭気の抗菌成分により抗菌効果を発揮している。最後の「生しょうが」と「根生姜」であるが、全ての食中毒菌で抗菌効果がなかった。これは抗菌成分の香味であるジネロンが揮発性の形態をとらないので抗菌効果が現れない。また「山葵」に「本わさび」を混ぜて、天然「山葵」の風味を損なわない、刺身の食中毒原因菌である「腸炎ビブリオ」に高い抗菌効果を発揮するワサビの香辛料であるが、これは「山葵」に「本わさび」を30%添加することにより、食中毒の心配から回避できる「特製ワサビ」を開発した。

## H-09

### 「風評被害から地元の牛乳を守る」

佐藤 美德、佐藤 未羽、遠藤 瑞季（福島県福島市渡利中学校）

東日本大震災から5年6か月が経過し、インフラの整備など被災地の復興もだいぶ進んでいる。しかし、被災3県の中で福島の復興については、原発事故の影響が大きく、農産物や畜産物などの風評被害は未だに続き、市場価格などでも震災以前のレベルには回復していない。

本校科学部は、そうした状況の中で「中学生の力でも復興の力になれないか」と考え、4年前から「家庭用植物工場」「塩害を植物を使って克服する」研究に取り組んできた。

本研究は、昨年からはじめ、安心・安全の検査を受けながらも風評被害を受ける牛乳消費の手助けになれないか、さらに給食時に残る牛乳を無駄なく活用できる方法がないかと考えた。牛乳の活用方法は、大きく2点から研究を進めた。

#### 1、市販のヨーグルトと手作りのヨーグルトの種菌を使った場合、ヨーグルトを効果的に作れる方法は何か

①発酵温度の調整 ②時間的な発酵の様子の変化 ③牛乳と種菌の割合を変えた場合 ④牛乳の種類による発酵の違い ⑤種菌の違いによる発酵の違い ⑥ラクトースを加えた時の発酵の速度の違いなどの条件を変え、糖度・酸度・糖酸比・pH・形状の変化を比較した。

#### 2、ヨーグルトのカゼインを用いて、生分解性プラスチックを作ることができないか

カゼインから生分解性プラスチックを取り出すには、加熱した牛乳に酢酸などを加えることで固形物として取り出す方法が知られている。この方法の場合、加熱のエネルギーとタンパク質を凝固させるための酸が必要となる。

乳酸菌を用いて、ヨーグルトとして発酵させ、ろ過させた後に、残渣としてろ紙上に残ったものを形状を整えることができれば、プラスチックとして利用が可能だと考えた。また、原材料も動物由来成分であるため、分解可能であるうため、生分解性プラスチックとしての利用価値が高まると考えら

れる。実際に、濃度を変えた酢酸を牛乳に加えた時と、ヨーグルトとして発酵させて作った場合に得られる固形物との比較を行った。

## H-10

### 「身近に眠るバイオマス」

武富 巧、金指 勇樹、二山 晃大（横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校）

Former students' research showed that iron is effective in generating hydrogen and methane gas, and that the more pH increase, the less amount of gas is generated.

Final goal of my research was “utilizing both electric power generation of iron reduction bacteria and gas generation of Methanogenesis archaeobacterium could make more energy” our research had two hypotheses. First, there is suitable environment. Second, a substance such as ammonia which is from putrefactive bacteria could be decomposed by photosynthetic bacteria and gas generation could be kept longer.

Soil from the bottom of Tsurumi River and from the school biotope, and weeded wild plants are prepared.

Four experiments were done for first hypothesis. First experiment was conducted to clarify the suitable temperature for Methanogenesis Archaeobacterium. Second experiment was to see the effectiveness of each soils on gas generation and decomposing cellulose how effect where mud came on amount of generation gas and breaking up cellulose. Third, experiment is how pH is suited to iron reduction bacteria. Forth, experiment is what kind of microorganism exists while generating gas and electricity. A experiment was done for second experiment. That experiment is to clarify the effect of the bacteria on leaves and in soil and effectiveness of light on amount of gas generation.

The results of five experiments showed that; 38℃ is suited to Methanogenesis Archaeobacterium; mud from a drain generate the most amount of gas and decomposed cellulose most quickly; low pH is not suited to iron reduction bacteria; there is a relationship between slender microorganism and generating gas; there is synergy between bacteria which from mud and leaves.

These result are not only supporting our hypotheses but also showing that “Synergy between bacteria which from mud and leaves” and “the condition of cellulose decomposition”. Further research with these results are being worked.

We would like to propose the way of continuous utilization of plant biomass. The way is as follows. First, bacteria in mud generate electricity. Second, bacteria generate gas by breaking up cytoplasm of plants. Third, photosynthetic bacteria keep down bad substance. Forth, glucose is made by breaking cellulose. Finally, bacteria make gas by decomposed into glucose. Shall we take some energy out which is so near you?

## H-11

### 「そら飛べ！？センチウ」

関野 将也（神奈川県立西湘高等学校□）

苔の中には多様な小型土壌動物が生息している。しかし、その生態はあまり研究がなされていない。そこで木の幹に着生する苔に焦点をあて、苔の中の小型土壌動物がどのような生態的特徴をしているのかを研究した。

まず始めに、今回研究する苔の中にどのような小型土壌動物が生息しているのかを調査するため、地面から苔までの高さが異なる4カ所の場所からそれぞれ日向と日蔭、合計8カ所の場所で苔を採取し、顕微鏡で観察した。

その結果、生息する小型土壌動物はセンチュウが大半を占め他の小型土壌動物はあまり確認されなかった。この事を踏まえ、センチュウ以外の生物ではデータの収集が困難であると判断し、センチュウに絞って研究を進めることにした。

次に苔が日向側と日蔭側のどちらにあるかでセンチュウの個体数に変化があるのかを調査した。そのために、地面から苔のある高さを揃えそれぞれ6カ所のコケを採取した。その結果、日向側より日蔭側の方が圧倒的にセンチュウの個体数が多かった。

次に、どの高さまでセンチュウが生息しているのか、またセンチュウの個体数と高さに関係があるのかを調査した。また、日向側は個体数が少ないため日蔭側でのみ苔を採取した。その結果、採取限界であった2.4mの高さまでセンチュウが生息しており、高さ個体数に関係はなかった。

ここで一つ疑問が生じた。体長1mmにも満たないセンチュウがどのようにして体長の2400倍の高さまで上ったのか。そこで調べてみると小型土壌動物は風によって飛ばされることがあるのだと判明した。そこで、本当にセンチュウが風によって飛ばされてくるのか調査した。そのため、木の横に木材で土台をつくり、プレパラートにワセリンを塗ったものを置き数週間放置した。その結果、センチュウは発見されなかったが、トビムシとダニが確認された。

## H-12

### 「二価鉄イオン( $\text{Fe}^{2+}$ )を用いて合成する光触媒がもたらす作用と効果」

浅利 優輝、石川 晃、石塚 裕貴、伊藤 健太、小林 陸人、□末永 基弘、鈴木 嘉人、  
芹澤 侑樹、□田中 文太郎、廣川 昂大、渡部 駿希□ (神奈川県立海洋科学高等学校)  
共同研究：杉本 幹生 (無有産研究所)

#### 《研究背景・目的》

相模湾および全国各地の沿岸で深刻化している磯焼けの原因に、水域の植物の生育に必要な二価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) の欠乏がある。この二価鉄イオンの作用・効果には、植物の生育とそれによる他の生物の活性化、水域のリンなどと反応・沈殿すれば、富栄養化が減少するといった浄化作用がある。また二酸化炭素と反応、固定化し沈殿すれば温暖化ガスの減少につながるという、水域だけでなく、光合成により大気のバランスもとる。

さらに、この二価鉄イオンの新たな展開が 研) 農研機構よりあった。それは、ポリフェノール類などの鉄還元性有機物と二価鉄イオンの合成により、可視光線下で殺菌・有機物質の分解に効果がある光触媒ができる (特許第5733781号、特開2015-044154) という画期的な発明であった。

上記より、例えば磯焼けと同じく問題視されているヘドロ水域に二価鉄イオンを供給すれば、生息する底層生物を活性化と鉄イオンの化学的結合により水質が改善され、さらに含有する腐食植物が生成する還元性有機物と光触媒を合成、ヘドロなどの有機物の分解を助け、生成された肥料・養分が水域に拡散すれば磯焼けの解決につながると思った。そこで、二価鉄イオンを継続的に生成する「鉄イオン溶出体」 (特許第5258171号) を開発した杉本幹生さんの協力のもと、光触媒がヘドロを分解する微生物にもたらす効果を調べた。

次に、二価鉄イオンのさらなる可能性を調べるため、研) 農研機構の光触媒による微生物の殺菌効果に着目した。本校のプールで使用する次塩素酸ナトリウムは、体がかゆい、目が痛いなどの症状がでる。鉄イオン溶出体を用いれば、鉄化合物などの鉄供給源は不要となり、安全で低コストの殺菌効果がある光触媒が合成可能ではないかと考えた。よって、鉄イオン溶出体が生成する二価鉄イオンとポリフェノール類などで合成された光触媒による微生物の殺菌効果を調べた。

#### 《方法》

1. ヘドロ中の微生物の活性を調べる実験では、本校近くの川より採取したヘドロを用いた。河川水を入れた1Lビーカーにヘドロと鉄イオン溶出体を入れ観察した。

2. 殺菌効果を調べる実験では、アスコルビン酸とカテキン粉末、鉄イオン溶出体を用いた。材料や配合比を変えて合成した数種の光触媒液中に大腸菌を入れ、太陽光下で静置後、LB培地に植菌し、大腸菌の増殖の有無を比較した。

#### 《結果》

実験継続中のため、結果は学会にて発表します。

### H-13

#### 「クマムシの熱耐性について」

久保田 一輝 (神奈川県立弥栄高等学校)

#### 背景

クマムシとは、緩歩動物門に属する体長0.1~0.01mm程の生物の総称で、現在では約1000種類が確認されている。水生、陸生が存在し、特に陸生クマムシはゆっくりと乾燥させると樽状態になり、熱、高圧、放射線、紫外線などへの耐性を持つようになることで知られている。

そこで、クマムシの耐性に興味を持ち、比較的容易に実験できる熱耐性の研究をすることにした。

#### 目的

これまでの研究では、80℃で5分間加熱すると全てのクマムシが生存した。そこで、生存できる限界の時間と温度を調べることにした。

#### 実験方法

クマムシをろ紙の上で48時間乾燥させ樽状態にし、一定の温度に設定した定温機に入れる。一定時間後取り出し、水をかけて生存を確認する。

### H-14

#### 「カイコの常在菌の特徴」

タダ 光邦、笹川 拓望、塗木 翔天、丸山 優樹 (横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校)

常在菌は健康状態に影響を与えることで近年注目を浴びている。このことに興味を持ち、ヒトの手の皮膚に存在する常在菌を培養して観察しているうちに人以外の生物にはどのような常在菌がいるの

か疑問に思った。そこで本研究では部活動で飼育しているカイコに注目した。カイコは薬物の基本的な代謝経路が哺乳類と共通していることから、創薬分野におけるモデル動物としても期待されている。本研究ではカイコのフンから得られる常在菌の特徴を調べることを目的とした。

飼育温度を25℃として10×16.5×3 (cm) の容器内に25個体のカイコを飼育し、そこからカイコのフンを4日おきに採取した。1齢と2齢においてはフンを直接、3齢以降はフンを蒸留水に懸濁したものを、LB寒天培地に植菌した。植菌したシャーレには空気穴をあけ、30℃のインキュベータ内において10日間培養した。エサとしてクワの葉を与えたグループと人工飼料を与えたグループに分け、植菌したシャーレにみられたコロニーを観察した。

得られたコロニーを比較すると、クワの葉を与えたグループの方が、人工飼料を与えたグループよりも種類が多様であった。クワの葉を与えたカイコのフンからは白いコロニーや黒いコロニー、茶色のコロニーが得られた。コロニーの中には菌糸が生えているものもあった。人工飼料を与えたカイコのフンから得られたコロニーは、白や粘り気のある薄い黄色のコロニーであった。グラム染色をしたところ、どちらのグループからもグラム陰性を示すコロニーが多くみられた。

クワの葉を与えたグループに見られた黒いコロニーは、クワの葉の懸濁液を植菌したものからも得られたため、この微生物はクワの葉から取り込まれたと考えられる。また、クワの葉で育てた個体は病気にかからなかったのに対し、人工飼料で育てた個体の多くが病気にかかった。病気にかかった個体の体内に含まれていたものを培養すると、ヒトの手のひらにいる常在菌と似たコロニーが観察されたことから、飼育時にカイコがヒトの常在菌に感染した可能性が示唆される。

クワの葉を与えたカイコと人工飼料を与えたカイコの常在菌には違いがみられたことから、今後はその違いが病気に対する抵抗力にも影響を与えるという仮説をたて、検証していく。

## H-15

### 「麹菌はどのようにして他個体を認識しているのか」

宇佐美 悠、角田 望、岸 里名子、佐藤 美瑠斗（横浜市立横浜サイエンスフロンティア高校）

麹菌は味噌や醤油など和食には欠かせない菌であり、日本の国菌にも指定されている。しかし、その生体に関する基礎的な研究はあまり行われていない。そこで本研究では、麹菌が同一の培地上で他のコロニーの菌糸を避け合う性質をもつことに着目し、どのようにして他のコロニーの菌糸を認識しているのかを解明することを目的とした。

研究を行うにあたり3つの仮説を立てた。1つ目は、菌糸が触れ合うことにより、認識しているというもの、2つ目は、培地の栄養の減少を感知することにより、認識しているというもの、3つ目は、麹菌がコロニーの周りに化学物質を放出し、それを感知することで、認識しているというものである。これらの仮説をもとに3つの実験を行った。なお、実験を行う際、懸濁液は1000個/μLと10個/μLを使用し、培地はPD培地、培養温度は30℃とした。

1つ目の実験は、麹菌が互いを認識し始める距離を調べる目的で行った。まず、基礎実験として1つの培地に麹菌を1箇所スポット植菌して培養し、毎日成長量を測定した。次に、1つの培地に35 mm離して麹菌を2箇所スポット植菌して培養し、毎日成長量を測定した。その結果、2箇所スポット植菌したとき、菌糸は触れ合うことなく、避け合いながら成長をつづけた。今後は、菌糸を避け合い始める距離を計測していく必要がある。

2つ目の実験は、麹菌が互いを認識する際に培地が関与しているかを調べる目的で行った。まず、寒天培地の中央を縦に幅5 mmメスで切り取り、培地を左右2箇所に分けた。次に、培地上に左右1箇所ず



つ麴菌をスポット植菌して培養し、菌同士が互いに避け合うかどうかを観察した。その結果、菌糸は避け合うことがなく、培地の端まで成長をつづけた。

3つ目の実験は、麴菌が互いを認識する際に化学物質が関与しているかを調べる目的で行った。まず、麴菌を蒸留水とジエチルエーテルでそれぞれ懸濁する。次に、濾過滅菌を行い、その溶液を麴菌のそばに垂らし、麴菌が溶液を避けるかを観察した。その結果、ジエチルエーテルにとかした脂溶性成分を避ける傾向は見られなかったが、蒸留水にとかした水溶性成分を避ける傾向が見られた。

これらの結果から、麴菌は培地を介して他の菌糸を認識し、それには水溶性の化学物質が関与していることが示唆された。

## H-16

### 「冬虫夏草」

保川 望、坂口 龍平（神奈川県立神奈川総合産業高等学校）

はじめに

漢方薬について興味を持ち、調べていくうちに冬虫夏草の存在を知った。文献調査の結果、冬虫夏草は人工栽培が難しいこと、生きている宿主と死んでいる宿主に菌を植え付けて子実体を形成させたときでは漢方としての薬効に違いがあると言われていることが分かった。そこで本研究では、冬虫夏草の人工栽培に取り組むことにした。人工栽培成功後は、薬効成分の調査に取り組んでいきたいと考えている。

今回は人工栽培の取り組み経過について報告する。

実験方法

1、菌株は*Cordyceps militaris* (NBRC 100741) を使用し、ポテトデキストロース寒天培地（PDA培地）にて培養した。

2、宿主生物は家蚕（*Bombyx.mori*）を選択し、卵から人工飼料にて飼育した。

<植菌 1 >

増殖させた*Cordyceps militaris* を、4 齢の家蚕および家蚕の蛹（冷凍保存の後に解凍したしたもの）に塗布した後、培養した。

<植菌 2 >

*Cordyceps militaris* をおがくず培地に植菌して培養した。また、宿主となる家蚕の蛹（冷凍保存の後に解凍したしたもの）を*Cordyceps militaris* を培養したPDA培地の上に置き感染させた。おがくず培地に感染させた家蚕の蛹を埋め、培養を開始した。培養の際には温度刺激を与えるために、培養温度は、初期は25℃とし、その後5℃→15℃→25℃のように変化させた。

結果および考察

植菌 1 の実験では、家蚕が4 齢時点で塗布したがそのまま成虫になった。菌には感染していると期待し、継続観察しているが子実体は見られていない。また、蛹も継続観察しているが同様に子実体の発生は見られていない。

植菌 2 の実験では、シメジ等の培養に用いられるおがくず培地を使用し、宿主の周りに *Cordyceps militaris* が多く存在する環境とした。また、子実体の発生促進の目的で温度刺激をあたえてみるこ

とした。その際、秋から冬、冬から春をイメージして変化させたが、現段階で子実体の発生は見られない。

今後は光による刺激で検討していく予定である。また、これまでの試料についても継続観察を行っていく。継続観察の結果等については発表にて報告する。

## H-17

### 「センチュウ (C.エレガンス) による漢方薬の機能評価」

小池 なるみ (神奈川県立神奈川総合産業高等学校)

□共同研究：安田 佳代 (東海大学)、石井 直明 (東海大学)

#### 《研究背景》

本校化学工学部では薬用植物の水耕栽培に挑戦しようとしている。栽培した薬用植物の効果は本校では評価困難であると考えられる。東海大学の石井らは C.エレガンスを用いて生薬の評価を行っている。センチュウの一種 C.エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) は、最長寿命約30日というライフサイクルの短さから、老化と活性酵素の関連についての研究や分化の研究等に利用されてきた。尿でがん識別をする研究などでも注目されている。

本研究では C.エレガンスを利用して、高等学校で可能な薬用植物の効果の簡易評価系確立を目指した。

#### 《実験方法》

三角フラスコ内の液体培地200mlに餌となる大腸菌を培養し、第一期幼虫の C.エレガンス (fer-15) 約2,000匹を加えた。1/5、1/10、1/20に濃度を調整した葛根湯、大柴胡湯、パブロンを加え、25.5℃で振盪培養し、以下の2つの実験を行った。

##### 〈系列□、幼虫観察系〉

幼虫期のC.エレガンスの体長を測ることにより、各サンプルが C.エレガンスの成長に与える影響を調べた。

##### 〈系列□、長期培養系〉

各サンプルが C.エレガンスの寿命に与える影響を調べた。成虫になった C.エレガンス、また、それに熱ストレスを加え寿命を短くした場合の死亡率、生存率の測定、及び行動解析を行った。

#### 《結果および考察》

系列□では、どのサンプルも濃度が濃いほど C.エレガンスの育ちが悪くなっていることから加えた薬剤が幼虫の生育に悪影響を与えていると考えられる。

系列□では、サンプルごとに大きく差が出た。葛根湯は生存率の大幅な変化は見られなかった。大柴胡湯は、一番濃度が低いサンプルが C.エレガンスの生存率を低下させている。しかし、幼虫の生育段階に問題はなく、動きが鈍くなったのも、死亡率が上がったのも日数が経過してからの事なので、長期培養することで影響が表れると考えられる。パブロンは、濃度が濃いほど生存率が低いが、大柴胡湯と同じく日数経過後は濃度の低いサンプルの生存率が低下している。

#### 《今後の展望》

各サンプルの結果にそれぞれ差が出たことより、高等学校での C.エレガンスを用いた漢方薬の評価は可能であると考えられる。

## H-18

### 「身の回りのアオカビを用いたペニシリンの抽出」

坂本 綾香（神奈川県立神奈川総合産業高等学校）

(はじめに)

ペニシリンは世界初の抗生物質であり、ドラマ「JIN〜仁〜」により抽出実験が注目された。文献を調査したところアオカビからペニシリンを得られた報告と得られなかった報告がみられた。そこで、ペニシリンの抽出実験に興味を持ち、挑戦することにした。いわゆるアオカビからペニシリンを抽出し抗菌性を確認すること、抽出条件が収量や活性に与える影響の検討を目指して実験を開始した。

(実験方法)

実験1 身の回りのアオカビからの抽出

1. 身近な環境からいわゆるアオカビを採取、純粋培養した。
2. アオカビを培養し培養液から菌体を分離後、活性炭を加えた。
3. 酸処理をし、塩基性水溶液を加えた。
4. 抽出液の活性を検定した。

実験2 ペニシリン産生株 (*P. flavigenum* 33246)での抽出実験

実験1と同様の実験を行った。

実験3 ペニシリン産生株 (*P. flavigenum* 33246)での抗菌性の確認

1. YS高栄養培地にペニシリン産生株を培養した。
2. 検定菌 (*K. rhizophila*)をハートインヒュージョン液体培地で増殖させミューラーヒントン寒天培地で混釈した。
3. 1で培養した菌体をくりぬき、2の培地に置いた。
4. 室温で1週間培養後、抗菌性があるかを観察した。

(結果)

実験1では抽出液を滴下した部分にも菌の増殖が見られ、阻止円を確認することはできなかった。原因を明らかにするために実験2および3を行ったが、いずれの場合も阻止円を確認することができなかった。

(考察)

実験1の結果から次の3つの可能性を考えた。

1. 使用したアオカビにはペニシリンの生産能力が無い（身近な環境から採取した菌株であるため）
2. 抽出方法に問題がある
3. 抗菌性の評価方法に問題がある

そこでまず、ペニシリンの生産能が確認されているNBRC33246株を使用し実験2 および 3を行った。しかし、いずれも抗菌活性を確認することができなかった。実験3の結果からペニシリンが産生されていない、あるいは濃度が薄かった可能性を考えている。このことから培養条件を検討する必要もあるのではないかと考えている。

#### (展望)

まず、培養条件の最適化を行いペニシリンの生産を確認できる条件を確立したい。その後、抽出方法および検定方法などを改善していく予定である。今後の検討結果等については発表にて報告する予定である。

#### 「ハイドロゲル・二価イオンを利用したカプセルの実用化の研究」

蠣崎 由衣花、原田 亜樹、川尻 萌花（神奈川県立平塚農業高等学校初声分校□）

私たちは、農業を学ぶ学生として、植物の種子の発芽、育成を植物にとって条件の良くない環境で実現させる方法の研究をしてきました。そして、高吸水性高分子化合物が活用できないかと発想し、様々な実験を続け、アルギン酸カルシウム膜の内部に架橋ポリアクリル酸重合体（ハイドロゲル）と二価鉄イオンを含ませたカプセルの開発に成功しました。これは、カプセルが水分や二価鉄イオンを吸収すると膨潤状態を維持し、内部の種子が育成困難な環境でも発芽、生育します。しかし、極度の乾燥状態に耐えるには改良が必要となり、発芽のタイミングをそろえる工夫も課題として残りました。今回は、新たな取り組みを計画し、この課題の解決に向けて取り組んでいきます。いろいろな経験を通して知見を得られましたのでここに発表します。

#### H-20

##### 「粘菌の発生に関する観察と孢子からの再生」

野田 恒平（神奈川県立鶴見高等学校）

2014年（平成26年）7月9日、自宅のベランダで青じそを育てていたプランターに、細胞性粘菌のススホコリが発生しました。ススホコリは、発生から子実体になるまでに約1日、移動距離は高さになると約15cmでした。

せっかくなので、ススホコリの孢子からススホコリを再生してみようと考えました。飼育法を調べてみると、寒天培地を使ってできると書いてありました。そこで、えさ（オートミール）を置いたり、水をあげないなど、11通りの方法を試し、そのうちの4つの寒天培地から変形体が発生しました。この後も、変形体は子実体になり、そこから同じようなススホコリが発生しています。これまでの実験・観察の報告と今後の課題について発表します。

## ランチョンセミナー

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

日時：10月25日(火) 12:30-13:20

会場：第2会場（展示室）

### Orbitrap Fusion 質量分析計により実現。ここまでできるオミクス解析

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 高原 健太郎

近年、生体内の分子全体を網羅的に解析し、生命現象を明らかにするオミクス解析が一般に行われる手法となってきました。その中でもプロテオミクス、メタボロミクスといったオミクス解析手法には、質量分析計が大きく貢献しております。本セミナーでは、業界で初めての3つのアナライザー（四重極、イオントラップ、Orbitrap）を搭載した Orbitrap Fusion 質量分析計を用いたオミクス解析の活用事例を紹介する。

#### メタボロミクス解析

サンプルに含まれる代謝物全体を検出するメタボロミクス/リポドミクス解析では、複雑な混合液から成分を見逃さず、かつ微量成分まで感度良く分離検出することが望まれます。Orbitrap Fusion 質量分析計は、わずかな  $m/z$  の違いを分離できる高質量分解能という特性を活かし、分子を見逃さず高感度で検出できます。質量分析計で観測される情報は質量なので、そこから化合物情報に結びつける必要があります。Orbitrap 検出器は理論値との誤差の少ない観測値が得られるため、精密質量から分子式を導くことができます。さらに、そのイオンを開裂させた MS/MS スペクトルにより化合物の部分構造の情報も得られます。MS/MS スペクトルを活用した化合物同定のために、無料の MS<sub>n</sub> スペクトルライブラリ mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) を公開しており、質量分析計による化合物同定を強力にサポートします。

#### プロテオミクス解析

質量分析計によるプロテオーム解析は nanoLC-MS/MS によって短時間に、高効率にタンパク質同定/定量が可能になりつつあります。例えば、Orbitrap Fusion 質量分析計を用いて、1.4 ug の酵母タンパク質酵素消化物をサンプルとした1時間の nanoLC-MS/MS 測定で、約 4000 タンパク質を同定されております (Herbert *et al.* 2014)。これは、酵母に発現しているタンパク質のほぼすべてをカバーしていると考えられます。もちろん、タンパク質同定といった定性的な情報だけでなく、定量的な情報も重要です。Orbitrap では高分解能・精密質量を利用した、label-free 定量が可能です。また、TMT ラベルを利用した多検体を同時に比較定量する解析手法も利用されています。

蛋白質翻訳後修飾解析では、Orbitrap Fusion は従来の標的イオンを不活性ガスと衝突させて開裂させる手法だけではなく、Electron Transfer Dissociation (ETD)を利用してリン酸化ペプチドや糖ペプチドの効率的な開裂が可能となり、正確な翻訳後修飾解析が実現します。



発表者索引  
(太字が発表者になります)

**A**

Abe, Mariko	阿部 真理子	P-112
〃		P-114
Abe, Masato	阿部 真人	<b>S3-4</b>
Abe, Midori	阿部 みどり	P-077
Abe, Tomoko	安部 智子	<b>P-047</b>
Aita, Yuto	會田 悠人	P-070
Aizawa, Hidenobu		P-036
Akiba, Rensuke	秋葉 練介	<b>P-209</b>
Akira, Ijiri		P-162
Akiyama, Hiroko	秋山 博子	P-135
Akiyama, Manami	秋山 真成美	P-060
Akiyama, Masaru	秋山 克	P-008
Akiyoshi-Hiraoka, Kenji	秋吉 研二	P-042
Amachi, Seigo	天知 誠吾	P-136
Amachi, Seigo		P-165
Anzai, Hiroshi	安齋 寛	P-205
Aoi, Yoshiteru	青井 議輝	P-032
〃		P-075
〃		P-149
〃		P-013
Aoyama, Hiroaki	青山 洋昭	P-071
〃		P-204
Aoyama, Yoshihiro	青山 嘉宏	P-048
Arai, Hironori	新井 宏徳	<b>P-126</b>
Arai, Miwa	荒井 見和	P-134
Arai, Wataru	荒井 渉	<b>P-063</b>
〃		P-064
〃		P-090
〃		P-145
Araki, Nobuo	荒木 信夫	P-137
〃		P-138
Asada, Tomoya	浅田 智也	<b>P-037</b>
Asai, Tatsuo	浅井 辰夫	P-085
Asakawa, Susumu	浅川 晋	P-076
〃		<b>P-128</b>
〃		P-129
Asano, Ryoki	浅野 亮樹	<b>P-077</b>
Ashimine, Noriko	安次嶺 典子	P-070
Asukai, Kouya	飛鳥井 滉也	P-217
Atomi, Haruyuki	跡見 晴幸	P-117
ayukawa, syotaro	鮎川 翔太郎	P-183
Azuma, Kentaro	東 健太郎	P-092
Azwani, Fatma		P-028

**B**

Baba, Ryuko	馬場 竜子	<b>P-129</b>
Baba, Tadashi	馬場 理	<b>P-031</b>
Baba, Tomoya	馬場 知哉	P-043
Betsuyaku, shigeyuki	別役 重之	P-223
Bien, Thi Lan Thanh		<b>P-236</b>
Bienes, Kathrina Mae Ulilang		P-084
Blanc-Mathieu, Romain		<b>P-235</b>
Bonnaud, Patrick	ボノー パトリック	P-020
Bossier, Peter		P-186
Bretschger, Orianna		P-172
Bryant, Donald A.		P-109

**C**

Chang, Wooje		P-116
Chen, Bin	陳 彬	P-123
Chen, Lei		P-227
Chiba, Akane		<b>P-139</b>

Chikaraishi, Yoshito	力石 嘉人	P-107
〃		P-117
Chiura, Hiroshi	千浦 博	P-246
Chohnan, Shigeru	長南 茂	P-041
〃		P-060
Cleenwerck, Ilse		P-186

**D**

Dadhwal, Vinay Kumar		P-126
Degawa, Yosuke	出川 洋介	P-220
Degushi, Shigeru	出口 茂	P-061
Dial, Roman		P-200
Dora, Hideo	道羅 英夫	P-245

**E**

Ebihara, Akiko	海老原 諒子	<b>P-141</b>
Eda, Shima	江田 志磨	P-030
〃		P-037
Ehashi, Yuka	江橋 由夏	<b>P-017</b>

**F**

Faruque, Omar M.		P-214
Fuchida, Shigeshi	淵田 茂司	P-095
Fujii, Kazushi	藤井 和史	P-121
Fujii, Mitsuki	藤井 美月	P-042
FUJII, YOSHIHARU		P-216
Fujikura, Katsunori	藤倉 克則	P-090
Fujimoto, Daiki	藤本 大樹	P-042
Fujimoto, Ryo	藤本 遼	<b>P-084</b>
Fujimura, Hiroyuki	藤村 弘行	P-198
Fujinaga, Shohei	藤永 承平	P-103
Fujisawa, Takatomo	藤澤 貴智	P-043
〃		P-124
Fujita, Nobuyuki	藤田 信之	P-117
Fujitani, Hirotsugu	藤谷 拓嗣	P-029
〃		P-035
〃		P-151
Fujiwara, Amane	藤原 周	P-178
Fujiwara, Atsushi	藤原 篤志	P-097
Fujiwara, Shin	藤原 慎	P-234
Fujiwara, Taketomo	藤原 健智	P-039
Fujiyama, Asao	藤山 秋佐夫	P-043
Fujiyoshi, So	藤吉 奏	<b>P-187</b>
Fukuda, Shinji	福田 真嗣	<b>IL-2</b>
Fukuda, Yasuhiro	福田 康弘	P-140
Fukuhara, Kouhei	福原 康平	<b>P-145</b>
Fukui, Manabu	福井 学	P-038
〃		P-099
〃		P-100
〃		P-146
Fukunaga, Sakae	福永 栄	<b>P-065</b>
Fukushima, Jun	福島 淳	P-077
Fukushima, Shunichi	福島 俊一	<b>P-182</b>
Fukuyama, Hanako	福山 華子	P-044
Fukuyama, Yuto	福山 宥斗	P-111
Fukuzaki, Satoshi	福崎 智司	P-186
Fumio, Inagaki		P-162
Furumai, Hiroaki	古米 弘明	P-012
〃		P-102
Fuse, Hiroyuki	布施 博之	P-148
Futahashi, Ryo	二橋 亮	P-206
Futamata, Hiroyuki	二又 裕之	P-028
Futo, Satoshi	布藤 聡	P-190

**G**

Gohara, kanaha	郷原 奏波	P-144
Gojobori, Takashi	五條堀 孝	P-097
Goluch, Edger D		P-075
Goto, Shiori	後藤 栞	<b>P-203</b>
Goto, Shuji	後藤 周史	P-091
Goto, Susumu	五斗 進	P-063
〃		P-064
〃		P-212
〃		P-233
〃		P-243
Guo, Yong	郭 永	P-141
〃		<b>P-224</b>
〃		P-225
〃		P-226

**H**

Habe, Hiroshi	羽部 浩	P-014
〃		P-015
〃		P-036
〃		P-148
Hachikubo, Akihiro	八久保 晶弘	P-158
Hackley, Keith C.		P-155
Hada, Emi	羽田 枝美	P-188
Hada, Kurumi	羽田 来留美	P-053
Hamabe, Jun	濱部 淳	P-194
Hamamoto, Yoko	浜本 洋子	<b>P-094</b>
Hamamura, Natsuko	濱村 奈津子	P-165
〃		<b>P-170</b>
Hamasaki, Koji	浜崎 恒二	P-064
Hanada, Satoshi	花田 智	P-101
〃		P-180
〃		P-182
Hanazawa, Syunsuke	花澤 俊祐	P-126
Hara, Toshihiko		P-227
Hara, Shuichi	原 修一	P-152
Harada, Nanomi	原田 尚美	P-178
Harada, Takeshi	原田 健史	P-117
Haruta, Shin	春田 伸	P-101
〃		P-105
〃		P-108
〃		P-110
〃		P-113
〃		P-180
〃		P-182
Hasegawa, Hiroshi	長谷川 浩	P-123
Hasegawa, Morifumi		P-045
Hasegawa, Toshihiro	長谷川 利拡	P-133
〃		P-134
Hashimoto, Hirofumi	橋本 博文	P-118
Hashimoto, Junko		P-071
Hashimoto, Kazuhito	橋本 和仁	P-175
Hashimoto, Masahito	橋本 雅仁	P-217
Hashimoto, Tomoyoshi	橋本 知義	P-088
Hata, Hokuto	畑 北斗	P-020
Hatada, Yuji	秦田 勇二	P-059
Hatakeyama, Nozomu	畠山 望	P-020
Hatamoto, Masashi	幡本 将史	P-137
〃		P-138
Hatano, Ryusuke		P-227
Hattori, Reiko	服部 黎子	<b>P-079</b>
Hattori, Satoshi	服部 聡	P-053
〃		<b>P-159</b>
〃		P-079

Hayakawa, Atsushi	早川 敦	P-077	〃	P-193	Itoh, Hideomi	伊藤 英臣	P-132	
Hayashi, Humio	林 史夫	P-057	Iino, Takao	飯野 隆夫	P-054	Itoh, Kazuhito	井藤 和人	P-027
Hayashi, Kentaro	林 健太郎	P-133	IIZUKA, MAKI		P-216	〃	P-049	
〃		P-134	Ijichi, Minoru	伊知地 稔	<b>P-178</b>	Itoh, Michihiro	伊藤 道浩	P-204
Hayashi, Nobuhiro	林 宣宏	P-118	Ikarashi, Masayuki	五十嵐 雅之	P-161	Itouga, Misao	井藤賀 操	P-062
Hayashi, Shohei	林 昌平	<b>P-027</b>	Ike, Kosuke	池 晃祐	<b>P-086</b>	Iwabuchi, Noriyuki	岩淵 範之	P-205
〃		P-049	Ike, Michihiko	池 道彦	P-230	Iwasaka, Yasunobu	岩坂 泰信	P-123
Hayashi, Tetsuya	林 哲也	P-145	Ikebe, Mari	池邊 茉莉	<b>P-221</b>	Iwasaki, Wataru	岩崎 渉	P-121
〃		P-179	Ikeda, Kazuhiro	池田 和弘	P-098	〃		P-179
Hayashida, Kyoko	林田 京子	<b>S5-1</b>	Ikeda, Tsukasa	池田 幸	P-019	Iwashita, Tomoki	岩下 智貴	<b>P-228</b>
Hayatsu, Masahito	早津 雅仁	P-135	Ikeda-Ohtsubo, Wakako	大坪 和香子	<b>P-207</b>	Iwata, Izumi	岩田 いづみ	P-096
Hibino, Yuko	日比野 優子	<b>P-134</b>	〃		P-209	Iwata, Ryutaro	岩田 隆太郎	P-205
Higashide, Masumi	東出 真澄	P-118	Ikegami, Kentaro	池上 健太郎	P-070	Izawa, Kazuki	伊澤 和輝	<b>P-195</b>
Hirai, Miho	平井 美穂	<b>P-067</b>	Ikenaga, Makoto	池永 誠	P-215	〃		P-197
〃		P-090	Ikeo, Kazuho	池尾 一穂	P-097	〃		P-238
〃		P-150	Imachi, Hiroyuki	井町 寛之	P-061	Izawa, Minami	井澤 陽	<b>P-083</b>
〃		P-163	〃		P-106			
Hiraishi, Akira		<b>P-009</b>	〃		P-157			
Hirakata, Yuga	平片 悠河	P-011	Imada, Chiaki	今田 千秋	P-246			
Hirano, Akinori	平野 明則	P-141	Imai, Eiichi	今井 栄一	P-118	Jha, Chandra Shekhar		P-126
Hirano, Atsushi	平野 惇	P-044	Imani, Junya	今仁 順也	P-118	Jinjkuji, Ken	神宮寺 賢	P-146
Hirano, Takashi	平野 隆	P-070	Imaya, Akihiro	今矢 明宏	P-221	Jorquera, Milko		<b>S2-1</b>
Hirao, Toshihide	平尾 聡秀	P-087	Imoto, Mai	井本 舞	P-166	Jung, Dawoon		P-075
Hiraoka, Satoshi	平岡 聡史	<b>P-121</b>	Imura, Satoshi		P-104			
Hirayama, Hisako	平山 仙子	P-066	Inaba, Kazuo	稲葉 一男	<b>S6-2</b>			
〃		P-112	Inaba, Tomohiro	稲葉 知大	P-015			
〃		<b>P-114</b>	〃		P-024	Kabeya, Daisuke	壁谷 大介	P-221
Hirose, Setsuko	広瀬 節子	<b>P-101</b>	〃		P-034	Kagi, Noriko	鍵 紀子	P-073
Hiroyuki, Imachi		P-162	〃		<b>P-036</b>	Kakimoto, Takashi	柿本 貴志	P-098
Hon, Tensyou	洪 天祥	P-123	〃		P-174	Kakizawa, Shigeyuki	柿澤 茂行	P-068
Honda, Daiske	本多 大輔	P-094	Inagaki, Fumio	稲垣 史生	P-106	Kaku, Nobuo	加来 伸夫	P-005
〃		<b>P-096</b>	Inamoto, Tamoi	稲元 民夫	P-077	Kamagata, Yoichi	鎌形 洋一	P-086
Honda, Riki	本田 力	P-047	Inoue, Sachi	井上 紗智	<b>P-034</b>	〃		P-155
Hongoh, Yuichi	本郷 裕一	P-062	Inoue, Shota	井上 翔太	P-042	〃		P-160
〃		P-184	Inubushi, Kazuyuki	犬伏 和之	P-126	〃		P-161
〃		P-191	〃		P-130	〃		P-228
〃		P-192	Irie, Kana	入江 佳奈	P-053	〃		P-229
〃		P-195	Ishiga, Takako	石賀 貴子	P-223	〃		P-230
〃		P-197	Ishiga, Yasuhiro	石賀 康博	P-223	〃		P-231
〃		P-199	Ishii, Kento	石井 拳人	<b>P-151</b>	〃		P-219
〃		P-200	Ishii, Satoshi		P-139	〃		P-232
〃		P-201	Ishii, Shunichi	石井 俊一	<b>P-172</b>	Kamata, Yasuaki	鎌田 泰彰	P-047
〃		P-238	Ishii, Shunichi		P-162	Kambara, Hiromi	蒲原 宏実	<b>P-149</b>
Honjyo, Masahiro	本荘 雅弘	P-028	Ishikawa, Hiroshi	石川 裕士	P-144	Kamijo, Takashi	上條 隆志	P-141
Hori, Chiaki	堀 千明	P-086	Ishikawa, Shugo	石川 修伍	P-004	Kanally, Robert	カナリー ロバート	P-001
Hori, Shota	堀 翔太	<b>P-053</b>	〃		P-154	〃		P-002
Hori, Tomoyuki	堀 知行	P-010	〃		P-153	〃		P-059
〃		P-014	Ishima, Tsuneaki	石間 経章	P-057	〃		P-083
〃		P-015	Ishimaru, Kana	石丸 佳苗	P-123	Kaneko, Takakazu		P-214
〃		P-036	Ishino, Yoshizumi	石野 良純	P-097	Kanemoto, Miho	金本 美穂	P-060
〃		P-055	Ishizawa, Yukie	石澤 由紀江	P-020	〃		<b>P-143</b>
Hoshino, Yuko	星野 裕子	<b>P-135</b>	Isobe, Kazuo	磯部 一夫	P-081	Kanesaki, Yu	兼崎 友	P-124
Hosoda, Akifumi	細田 晃文	P-166	〃		P-132	Kanno, Manabu	菅野 学	<b>P-219</b>
Hosomi, Masaaki	細見 正明	P-010	〃		P-142	Kanno, Nanako	菅野 菜々子	<b>P-180</b>
〃			〃		P-144	Kano, Akihiro	狩野 彰宏	P-158
			Isoshima, Takashi	磯島 隆史	P-072	Kasahara, Yasuhiro	笠原 康裕	P-165
			Isshiki, Rino	一色 理乃	<b>P-029</b>	〃		P-227
			〃		P-058	Kasai, Hidekazu	河西 英一	P-065
			〃		P-056	Kashima, Hiroyuki		<b>P-016</b>
Ichinose, Yuki	一瀬 勇規	P-223	Itai, Takaaki	板井 啓明	<b>S1-3</b>	Kasuga, Ikuro	春日 郁朗	P-012
Idei, Airi		<b>P-168</b>	Itakura, Manabu	板倉 学	P-135	〃	春日 郁朗	P-102
Igai, Katsura	猪飼 桂	<b>P-199</b>	Ito, Konomi	伊藤 このみ	P-190	Kasuya, Ken-ichi	粕谷 健一	P-040
〃		P-201	Ito, Michihiro	伊藤 通浩	P-198	〃		P-078
Iguchi, Hiroyuki	井口 博之	<b>P-181</b>	Ito, Takaomi	伊東 隆臣	P-190	Katai, Janos		<b>P-130</b>
Ihara, Hideyuki	猪原 英之	<b>P-055</b>	Ito, Tsukasa	伊藤 司	P-057	Kataoka, Taisuke	片岡 大亮	<b>P-245</b>
Iida, Kazuki	飯田 和輝	P-177	Ito, Yoshihiro	伊藤 嘉浩	P-072	Kataoka, Takafumi	片岡 剛文	<b>P-089</b>
Iida, Takeshi	飯田 剛史	P-161						
Iida, Toshiya	飯田 敏也	P-080						



"		P-180	Morikawa, Masaaki	森川 正章	P-228	"	P-189	
Matsuura, Tetsuhisa	松浦 哲久	P-149	"		P-229	Nakagawa, Tatsunori	中川 達功	P-146
Matsuura, Yu	松浦 優	P-202	"		P-230	"		P-151
"		P-203	"		P-231	NAKAHARA, NOZOMI	中原 望	P-157
Matsuyama,shintarou	松山 伸太郎	<b>P-131</b>	Morimoto, Yuh	森本 ゆふ	P-031	Nakaho, Kazuhiro	中保 一浩	P-080
Mayumi, Daisuke	眞弓 大介	<b>P-161</b>	Morinaga, Kana	森永 花菜	P-022	Nakai, Ryosuke	中井 亮佑	<b>P-043</b>
McGlynn, Shawn		P-113	"		<b>P-025</b>	Nakai, Yutaka	中井 裕	P-140
"		<b>P-116</b>	"		P-239	Nakajima, Mutsuyasu	中嶋 睦安	P-205
"		P-168	Morisada, Kazuhito	森貞 和仁	P-221	Nakajima, Yasuhiro	中島 泰弘	P-135
Meng, Xian Ying	孟 憲英	P-206	Morisaki, Hisao	森崎 久雄	P-030	Nakamura, Hiroshi	中村 浩史	P-133
"		P-202	"		P-037	Nakamura, Kohei	中村 浩平	P-167
Mergaert, Peter		P-206	Morita, Mayumi	森田 麻友美	P-129	Nakamura, Koji	中村 幸治	P-208
Michinaka, Atsuko	道中 敦子	<b>P-003</b>	Moriya, Shigeharu	守屋 繁春	<b>P-062</b>	Nakamura, Ryuhei	中村 龍平	S1-2
Mikaelyan, Aram		P-207	"		P-196	Nakamura, Shinichiro	中村 振一郎	P-072
Mikami, Tatsuya	三上 達也	S5-2	Moriya, Yuki	守屋 勇樹	P-063	Nakamura, Shogo	中村 省吾	P-120
Minami, Maiko	南 茉莉子	P-070	"		P-064	Nakamura, Takamichi	中村 孝道	<b>P-008</b>
Minamisawa, Kiwamu	南澤 究	P-135	Moriyama, Yuriko	森山 裕理子	<b>P-048</b>	Nakamura, Yasukazu	中村 保一	P-043
Minegishi, Hiroaki	峯岸 宏明	<b>P-150</b>	Morohoshi, Tomohiro	諸星 知広	P-019	"		P-124
Mino, Sayaka	美野 さやか	P-066	"		P-035	Nakamura, Yoji	中村 洋路	P-097
"		<b>P-106</b>	"		P-218	Nakane, Masami	中根 麻冴美	<b>P-088</b>
"		P-107	Motoki, kaori	元木 香織	P-188	Nakanishi, Fumiko	中西 布美子	<b>P-220</b>
Minoda, Naoto	蓑田 尚人	<b>P-215</b>	Mugishima, Yuta	麥島 雄太	<b>P-238</b>	Nakanishi, Tetsuhiro	中西 哲大	P-070
Mise, Kazumori	美世 一守	<b>P-081</b>	Mugita, Ai	麦田 藍	P-177	Nakano, Kazuma	中野 和真	P-070
Mishima, Iori	見島 伊織	P-098	Muraguchi, Yusuke	村口 雄亮	P-054	Nakano, Shin-ichi	中野 伸一	P-103
Misumi, Kyohei	三角 恭平	<b>P-102</b>	Murakami, Chiho	村上 千穂	<b>P-032</b>	Nakano, Yoshikatsu	中野 義勝	P-198
Mita, Hajime	三田 肇	P-118	Murakami, Takumi	村上 匠	<b>P-200</b>	Nakao, Haruka	中尾 春香	P-037
Mitani, Yasuo	三谷 恭雄	P-202	Murakami, Yuka	村上 由夏	P-145	Nakao, Ryoma	中尾 龍馬	P-208
"		P-206	Muramoto, Yasunori	村元 靖典	P-080	Nakaoka, Hidenori		<b>P-023</b>
Mitsuboshi, Masahiro	三星 暢公	<b>P-076</b>	Murano, Yuka	村野 由佳	<b>P-119</b>	Nakashima, Sae	中島 沙映	P-221
Mitsunobu, Satoshi	光延 聖	P-153	Murase, Jun	村瀬 潤	<b>P-127</b>	Nakata, Hideaki	中田 英昭	P-147
"		P-164	"		P-134	Nakaya, Rie	中谷 理愛	P-091
"		P-169	Muroi, Fumihito	室井 文篤	P-078	Nalivata, Patson		P-139
"		P-171	Murono, Shingo	室野 晋吾	S5-2	Namiki, Shota	双木 笙太	<b>P-156</b>
Miura, Ryuji	三浦 隆治	P-020	Muto, Hisashi	武藤 久	<b>P-066</b>	Nanba, Kenji	難波 謙二	P-211
MIWA, HIROK		P-216	"		P-107	Narihiro, Takashi	成廣 隆	<b>P-006</b>
Miwa, Hiroki	三輪 大樹	<b>P-213</b>	<b>N</b>			"		P-011
"		P-214	Nagai, Hiroki	永井 宏樹	<b>S5-3</b>	Narisawa, Kazuhiko	成澤 才彦	P-220
Miyagawa, Satoshi	宮川 訓	P-190	Nagai, Kouta	永井 航太	P-042	"		P-222
Miyagawa, Yoshimi	宮側 賀美	P-190	Nagai, Satoshi	永井 智	P-017	"		P-224
Miyagi, Atsuko	宮城 敦子	P-207	"		P-021	Navarro, Ronald		P-225
Miyahara, Masaya	宮原 雅也	P-121	"		P-097	"		P-226
Miyakawa, Atsuo	宮川 厚夫	P-119	Nagai, Satoshi	長井 敏	P-212	"		P-014
Miyamoto, Akira	宮本 明	P-020	Nagai, Tomoyuki		P-188	"		P-015
Miyano, Yasuyuki	宮野 泰征	P-174	Nagai, Yukiko	長井 裕季子	P-212	"		P-036
Miyata, Yasushi	宮田 康史	P-177	Nagakura, Mikoto	長倉 美琴	P-188	Nealson, Kenneth H.		P-172
Miyazaki, Junichi	宮崎 淳一	P-106	Naganuma, Takeshi	長沼 毅	P-086	Nemoto, Yuuki	根元 裕規	P-002
"		P-114	Nagaosa, Kazuyo	永翁 一代	P-043	Ngo, Vy Thao		P-236
"		P-066	"		P-069	Nguyen, Hien P.		<b>P-214</b>
Miyazaki, Masayuki	宮崎 征行	<b>P-061</b>	Nagasaki, Keizo	長崎 慶三	P-156	Niki, Hironori	仁木 宏典	P-043
"		P-117	Nagata, Keiji	長田 啓司	<b>S4-1</b>	Nishi, Eiji	西 英二	P-210
Mizutani, Yukino	水谷 雪乃	<b>P-186</b>	Nagata, Ryouyusuke	永田 亮佑	P-024	Nishi, Shinro	西 貞郎	P-059
Mochimaru, Hanako	持丸 華子	<b>P-160</b>	Nagata, Yuji	永田 裕二	<b>P-107</b>	"		P-067
Mochizuki, Tomohiro	望月 智弘	<b>P-247</b>	"		P-082	"		P-114
"		P-249	Nagatake, Arata		S3-2	"		P-248
Mochizuki, Yuji	望月 悠司	P-199	Nagayama, Chieko	長山 千恵子	P-227	"		P-249
Mogi, Ryosuke	茂木 亮介	<b>P-024</b>	Nagayama, Kyoko	永山 恭子	P-020	Nishida, Akifumi	西田 暁史	<b>P-183</b>
Mori, Fumiaki	森 郁晃	P-092	Nagura, Yuichi	名倉 有一	<b>P-208</b>	Nishida, Kiyonori	西田 清徳	P-190
"		<b>P-147</b>	Nakagaki, Toshiyuki	中垣 俊之	P-195	Nishide, Hiroyo	西出 浩世	P-043
Mori, Hiroshi	森 宙史	P-207	Nakagawa, Fumiko	中川 書子	<b>S6-4</b>	Nishihara, Arisa	西原 亜理沙	P-105
"		S3-2	Nakagawa, Kazumichi	中川 和道	S1-4	"		<b>P-113</b>
Mori, Kazuhiro	森 一博	P-228	nakagawa, mayuko	中川 麻悠子	P-118	Nishimura, Kyohei	西村 恭平	<b>P-013</b>
"		P-229	Nakagawa, Satoshi	中川 聡	P-183	Nishimura, Yosuke	西村 陽介	<b>P-233</b>
"		P-230	"		P-066	"		P-243
Mori, Koji	森 浩二	P-117	"		P-106	Nishimura, Yuki	西村 祐貴	<b>P-196</b>
Mori, Shoichi		P-100	"		P-107	Nishino, Shigeto	西野 茂人	P-178
Mori, Yumi	森 裕美	<b>P-140</b>	"		P-187	Nishiyama, Eri	西山 依里	P-082

Nishiyama, Hiroki		<b>P-212</b>	Ogata, Hiroyuki	緒方 博之	P-212	Onizawa, Rina	鬼澤 里奈	<b>P-022</b>
Nishizawa, Manabu	西澤 学	P-115	"		P-233	Ono, Kenji	小野 賢治	P-221
Nishizawa, Tomoyasu	西澤 智康	P-045	"		P-235	Ono, Kiyomi		P-227
"		P-060	"		P-242	Ono, Shoko	小野 祥子	P-215
"		P-088	"		P-243	Ootsuka, Mina		<b>P-045</b>
"		P-141	"		<b>S4-2</b>	Osaka, Noriko	大阪 典子	P-161
"		P-143	Ogawa, Kazuyoshi	小川 和義	P-026	Oshiki, Mamoru	押木 守	P-138
"		P-224	Ogawa, Seiya	小川 誠也	P-217	"		P-137
"		P-225	Ogi, Yutaro	荻 祐太郎	P-004	Otagiri, Masato	小田切 正人	P-196
"		P-226	Ogura, Yoshitoshi	小椋 義俊	P-145	Otsuka, Shigeto	大塚 重人	P-081
Nitta, Youji	新田 洋司	P-060	"		P-179	"		P-132
Njira, Keston		P-139	Oguro, Tatsuki	大黒 達希	<b>P-111</b>	Ouch, Genki	大内 源樹	<b>P-229</b>
Nobu, Masaru K.		P-006	Ohashi, Akiyoshi	大橋 晶良	P-013	Oyagi, Hideo	大八木 英夫	P-103
Noda, Mayuko	野田 真優子	<b>P-211</b>	"		P-032	Ozaki, Atsumi	尾崎 温美	<b>P-073</b>
Noda, Naohiro	野田 尚宏	P-074	"		P-075	Ozaki, Noriatsu	尾崎 則篤	P-149
Noda, Satoko	野田 悟子	P-193	"		P-149	"		P-013
Noguchi, Katsunori	野口 勝憲	P-076	Ohashi, Yuri	大橋 優莉	<b>P-164</b>	Ozawa, Kohei	小澤 昂平	<b>P-002</b>
Nomaki, Hidetaka	野牧 秀隆	P-150	"		P-169			
Nomura, Nobuhiko	野村 暢彦	P-017	"		P-171			
"		P-018	Ohbayashi, Tsubasa	大林 翼	P-203			
"		P-019	"		<b>P-206</b>	Panno, Samuel V.		P-155
"		P-021	Ohki, Shun	大木 駿	P-070	Park, Sanghwa	朴 相和	<b>P-071</b>
"		P-022	Ohkouchi, Naohiko	大河内 直彦	P-117	"		P-204
"		P-024	Ohkuma, Moriya	大熊 盛也	P-054			
"		P-025	"		P-080			
"		P-026	"		P-184			
"		P-033	"		P-191	Regan, John M.		P-016
"		P-034	"		P-192	Riya, Shohei	利谷 翔平	P-010
"		P-174	"		P-193	Romain, Blanc-Mathieu		P-242
"		P-176	"		P-195			
"		P-208	"		P-196			
"		P-223	"		P-197			
"		P-239	"		P-199	Sadowsky, Michael		<b>S2-2</b>
Normand, Philippe		P-217	"		P-201	Saito, Hikari	齊藤 ひかり	<b>P-189</b>
Nouzaki, Katsuya	納寄 克也	P-015	"		P-238	Saito, Hiroaki	齋藤 洋昭	<b>P-185</b>
Nozaki, Tatsuo	野崎 達生	P-164	Ohta, Hiroyuki	太田 寛行	P-045	Saito, Masafumi	齋藤 誠史	P-115
Nshi, Shinro	西 真郎	P-090	"		P-060	Saito, Tadao	齋藤 忠夫	P-209
Nunoura, Takuro	布浦 拓郎	P-067	"		P-088	Saito, Tomoyuki	齋藤 智之	P-221
"		P-090	"		P-141	Saito, Toshihito	齋藤 利仁	P-081
"		P-106	"		P-143	Saito, Yasuhisa	齋藤 保久	P-028
"		P-107	"		P-222	Saitoh, Seikoh	齋藤 星耕	P-071
"		<b>P-117</b>	"		P-224	"		P-204
"		P-150	"		P-225	Sakai, Hidemitsu	酒井 英光	P-133
"		P-163	"		P-226	"		P-134
"		P-247	Ohta, Yukari	大田 ゆかり	P-059	Sakai, Keisuke	堺 奎介	<b>P-144</b>
"		P-249	Ohtsubo, Yoshiyuki	大坪 嘉行	P-082	Sakai, Kenji	酒井 謙二	P-084
			"		S3-2	"		P-210
			Ojima, Noriyuki	小島 紀幸	P-207	Sakai, Kentaro	境 健太郎	P-044
			Oka, Hiroaki	岡 裕章	<b>P-142</b>	Sakai, Masao	境 雅夫	P-215
			Okamoto, Akihiro	岡本 章玄	P-175	Sakai, Miho	酒井 海帆	<b>P-201</b>
			Okamoto, Rei	岡本 怜	<b>P-099</b>	Sakai, Sanae	酒井 早苗	P-061
			Okamoto, Toru	岡本 透	P-221	"		P-157
			Okazaki, Shin	岡崎 伸	P-213	"		<b>P-163</b>
			"		P-214	Sakai, Shun		P-009
			"		P-216	Sakai, Yoriko	酒井 順子	<b>P-133</b>
			Okazaki, Yoshihisa	岡崎 友輔	P-212	Sakake, Ai	砂掛 愛	P-084
			Okazaki, Yusuke	岡崎 友輔	<b>P-103</b>	Sakata, Masahiro	坂田 昌弘	P-164
			Okubo, Kimono	大久保 希実子	P-148	Sakata, Susumu	坂田 将	P-160
			Okubo, Takashi	大久保 卓	P-134	"		P-161
			Okuda, Kei	奥田 圭	P-211	Sakatoku, Akihiro	酒徳 昭宏	P-120
			Okuda, Shujiro	奥田 修二郎	P-058	Sako, Yoshihiko	左子 芳彦	P-111
			Okudaira, Kyoko	奥平 恭子	P-118	"		P-234
			Okugawa, Yuki	奥川 友紀	P-084	"		P-243
			Omae, Kimiho	大前 公保	P-111	Sakurai, Shunya		P-212
			Omori, Sawako	大盛 佐和子	<b>P-068</b>	Sakurai, Takanori	櫻井 喬典	P-078
			Onishi, Kazunari	大西 一成	P-123	Sameshima, Reiko	鮫島 玲子	P-085

## O

Obana, Nozomu	尾花 望	P-017						
"		<b>P-018</b>						
"		P-021						
"		P-022						
"		P-024						
"		P-025						
"		P-034						
"		P-174						
"		P-208						
"		P-223						
"		P-239						
Obayashi, Yumiko	大林 由美子	<b>P-093</b>						
"		P-236						
Ogasawara, Wataru	小笠原 渉	P-137						
Ogata, Atsushi	尾形 敦	P-014						
"		P-015						
"		P-036						



Sandaa, Ruth-Anne	P-235	Shiroma, Akino	城間 安紀乃	P-070	''	P-114	
Sandor, Zsolt	P-130	Shizukuda, Mai	雫田 麻衣	P-088	''	<b>P-115</b>	
Sanford, Robert A.	P-155	Shudo, Takashi	首藤 誉史	<b>P-041</b>	''	P-117	
Sasakawa, Syuutarou	P-123	Shuto, Aya	首藤 彩	P-117	''	P-150	
Sasaki, Natsumi	P-159	Sida, Yousuke	志田 洋介	P-137	''	P-157	
Sasaki, Satoshi	P-118	Soda, Naoki	曾田 直紀	P-159	''	P-162	
''	P-119	Solomon, Paulo		<b>S2-3</b>	''	P-163	
Sasaki, Takashi	P-031	Someya, Nobutaka	染谷 信孝	<b>P-218</b>	''	P-171	
Sato, Arisa	P-054	Sone, Teruo	曾根 輝雄	P-086	''	P-188	
Sato, Kei	P-120	''	''	P-206	''	P-247	
Sato, Nagisa	P-193	''	''	P-232	''	P-248	
Sato, Ryo	<b>P-020</b>	Sonobe, Seiji	園部 誠司	<b>S6-3</b>	''	P-249	
Sato, Shusei	P-214	Sonoda, Saki	園田 咲	<b>P-085</b>	''	S1-2	
Sato, Takaaki	P-117	Suda, Shoichiro	須田 彰一郎	P-198	Takaki, Yoshihiro	高木 善弘	P-066
Sato, Takehiko	P-119	Suenaga, Toshikazu	未永 俊和	<b>P-010</b>	''	P-067	
Sato, Yu	<b>P-039</b>	Sugawara, Hiroki	菅原 弘紀	P-005	''	P-090	
''	P-154	Sugaya, Kaito		P-191	''	P-107	
Sato, Yuya	<b>P-014</b>	Sugimoto, Chihiro	杉本 千尋	S5-1	''	<b>P-112</b>	
Satoh, Takanori	<b>P-042</b>	Sugimoto, Yuta	杉本 侑大	<b>P-240</b>	''	P-117	
Satou, Kazuhito	<b>P-070</b>	Sugiyama, Haruka	杉山 遙夏	P-031	''	P-157	
Sawabe, Tomoo	P-106	Sumida, Akihiro		P-227	''	P-188	
''	P-189	Sun, Han		<b>P-226</b>	''	P-247	
Sawayama, Shigeki	P-066	Sunairi, Michio	砂入 道夫	P-205	''	P-248	
''	P-107	Sunamura, Michinari	砂村 倫成	<b>P-152</b>	''	P-249	
''	P-187	Sunata, Takashi	砂田 高志	P-189	''	P-114	
''	P-189	Suwa, Yuichi	諏訪 裕一	P-144	Takami, Hideto	高見 英人	P-063
Segawa, Takahiro	P-200	''	''	P-145	''	<b>P-064</b>	
Sekiguchi, Tetsushi	P-029	Suyama, Kousuke	巢山 弘介	P-027	''	P-145	
''	P-056	''	''	P-049	Takamizawa, Kazuhiro	高見澤 一裕	P-167
Sekiguchi, Yuji	P-155	Suzaki, Hirokazu	須崎 寛和	P-147	Takao, Yoshitake	高尾 祥文	P-093
Sekiko, Yuya	P-171	Suzaki, Toshinobu	洲崎 敏伸	<b>S6-5</b>	Takasaki, Kazuto	高崎 一人	<b>P-190</b>
Senoo, Keishi	P-081	Suzuki, Ai	鈴木 愛	P-020	Takasaki, Mituru	高崎 みつる	P-055
''	P-132	Suzuki, Kenshi	鈴木 研志	<b>P-028</b>	Takashima, Yusuke	高島 勇介	P-220
''	P-142	Suzuki, Koji	鈴木 光次	P-091	''	''	<b>P-222</b>
Senpuku, Hidenobu	P-034	Suzuki, Miwa	鈴木 美和	P-040	Takashi, Haruka	高城 遥	<b>P-105</b>
''	P-208	''	''	<b>P-078</b>	Takasuka, Taichi	高須賀 太一	P-086
Sepulveda, Gonzalo B.	P-200	Suzuki, Miyu	鈴木 美有	<b>P-012</b>	Takato, Shunsuke	高戸 峻介	P-120
Sharmin, Dilruba	<b>P-225</b>	Suzuki, Satoru	鈴木 聡	P-046	Takemoto, Kazuhiro	竹本 和広	P-063
Shibata, Hideaki	P-142	''	''	P-236	''	''	P-064
Shibata, Mitsue	P-221	''	''	P-240	Takemura, Masaharu	武村 政春	<b>S5-2</b>
Shibuya, Takazo	P-115	''	''	P-241	Takemura, Moeka	竹村 萌香	P-027
Shigemura, Hiroyuki	P-003	Suzuki, Seiji	鈴木 誠治	<b>P-246</b>	Takeshita, Kazutaka	竹下 和貴	<b>P-202</b>
Shigyo, Nobuhiko	<b>P-087</b>	Suzuki, Shino	鈴木 志野	P-172	''	''	P-203
Shiiba, Kiwamu	P-047	Suzuki, Yohey	鈴木 庸平	P-158	''	''	<b>AL-3</b>
Shimada, Yu	<b>P-035</b>	Suzuki, Yumi	鈴木 優美	P-164	Takeshita, Toshihide	竹下 俊英	<b>P-001</b>
Shimamura, Hiroko	<b>P-019</b>	''	''	<b>P-169</b>	Takeuchi, Nozomu	竹内 望	P-200
Shimoji, Makiko	P-070	''	''	P-171	Takeyama, Haruko	竹山 春子	P-198
Shimomura, Yumi	P-135				Takita, Masaki		P-009
Shimura, Yoicro	P-077				Takizawa, Reika	滝澤 玲香	<b>P-040</b>
Shinmura, Anna	P-229				Tallai, Magdolna		P-130
''	P-231	Tabata, Makoto	田端 誠	P-118	Tamaki, Hideyuki	玉木 秀幸	P-155
Shinno, Takahiro	P-149	Tachibana, Yuya	橘 熊野	P-040	''	''	P-157
Shintani, Masaki	P-054	''	''	P-078	''	''	P-160
''	P-245	Tada, Chika	多田 千佳	P-140	''	''	P-161
Shin-ya, Kazuo	P-071	Tada, Yuya	多田 雄哉	<b>P-091</b>	''	''	P-219
Shinzato, Chuya	P-198	Tago, Kanako	多胡 香奈子	P-135	''	''	P-228
Shinzato, Misuzu	P-070	Takahashi, Fuyumi	高橋 冬実	P-085	''	''	P-229
Shinzato, Naoya	P-071	Takahashi, Motoyuki	高橋 基之	P-098	''	''	P-230
''	P-154	Takahashi, Reiji	高橋 令二	P-146	''	''	P-231
''	<b>P-204</b>	''	''	P-151	Tamari, Daiki	玉利 大樹	P-131
Shiozaki, Takuhei	P-178	Takahashi, Satoru	高橋 智	<b>P-148</b>	Tamazawa, Satoshi	玉澤 聡	P-161
Shiozawa, Keisuke	P-159	Takai, Ken	高井 研	P-061	Tame, Akihiro	多米 晃裕	P-107
Shirai, Yumi	P-204	''	''	P-066	''	''	P-189
Shiraishi, Hayata	P-217	''	''	P-106	Tamotsu, Hinako	保 日奈子	P-070
Shiratori, Yutaka	P-126	''	''	P-107	Tamura, Hiroto	田村 廣人	P-166
''	P-132	''	''	P-112	Tanaka, Atsushi	田中 敦	P-103

Tanaka, Daiki	田中 大器	P-029
"	"	P-056
Tanaka, Daiki	田中 大貴	<b>P-046</b>
Tanaka, Daisuke	田中 大祐	<b>P-120</b>
Tanaka, Emiko	田中 英美子	P-171
Tanaka, Junichi	田中 淳一	P-204
Tanaka, Keiko	田中 圭子	P-114
Tanaka, Reiji	田中 礼士	P-186
Tanaka, Ryoichi	田中 亮一	<b>P-015</b>
Tanaka, Shikiko	田中 志貴子	P-204
Tanaka, Sho	田中 翔	<b>P-049</b>
Tanaka, Yasuhiro	田中 靖浩	P-228
"	"	P-229
"	"	P-230
"	"	P-231
Tandogan, Nil	"	P-075
Tani, Atsushi	谷 篤史	P-158
Taniguchi, Takeaki	谷口 丈晃	P-063
"	"	P-064
Tank, Marcus	"	P-109
Tanoue, Ryo	田上 諒	<b>P-082</b>
Taoka, Yousuke	田岡 洋介	<b>P-044</b>
Tarao, Mitsunori	多羅尾 光徳	<b>P-194</b>
Tashiro, Kosuke	田代 康介	P-097
"	"	P-028
Tashiro, Yukihiko	田代 幸寛	P-084
"	"	P-210
Tasumi, Eiji	田角 栄二	P-150
"	"	<b>P-162</b>
"	"	P-163
Tateno, Ryunosuke	館野 隆之輔	P-142
Tateno, Yuka	立野 由佳	P-228
Terada, Akihiko	寺田 昭彦	P-010
Terado, Naho	寺戸 菜穂	<b>P-232</b>
Terashima, Mia	寺島 美亜	P-086
"	"	<b>P-100</b>
"	"	P-206
Teruya, Kuniko	照屋 邦子	P-070
Thauer, Rudolf Kurt	"	<b>IL-1</b>
Thiel, Vera	"	<b>P-109</b>
Tinh, Tran Kim	"	P-126
Tobita, Hiroyuki	飛田 博順	P-221
Tobo, Atsushi	當房 陸	P-006
"	"	<b>P-011</b>
Tobo, Yutaka	當房 豊	P-122
Toju, Hirokazu	東樹 宏和	<b>S3-1</b>
Tokida, Takeshi	常田 岳志	P-133
"	"	P-134
Tokuda, Gaku	徳田 岳	P-184
Tokunou, Yoshihide	徳納 吉秀	<b>P-175</b>
Tomaru, Yuji	外丸 裕司	P-237
Tomita-Yokotani, Kaori	富田(横谷) 香織	P-118
"	"	P-124
Tomozawa, Rino	富澤 璃乃	P-146
Tonomura, Mimori	殿村 美森	<b>P-136</b>
Tonouchi, Akio	殿内 暁夫	P-048
"	"	<b>P-050</b>
"	"	P-051
"	"	P-052
TOYA, MASASHIRO	遠矢 正城	<b>P-033</b>
Toyama, Tadashi	遠山 忠	P-228
"	"	P-229
"	"	P-230
"	"	P-231
Toyoda, Atsushi	豊田 敦	P-043
Toyofuku, Masanori	豊福 雅典	P-019

"	"	P-022
"	"	P-024
"	"	P-025
"	"	P-026
"	"	P-033
"	"	P-239
Toyofuku, Takashi	豊福 高志	P-188
Toyota, Koki	豊田 剛己	P-007
Tozawa, Erina	戸澤 恵里奈	<b>P-231</b>
Tsamba, Oyungerel	ツァンバ オユンゲレル	<b>P-051</b>
Tsuboi, Arisa	坪井 亜里沙	P-062
Tsuboi, Shun	坪井 隼	<b>P-095</b>
Tsuchiya, Tatsuya	土屋 達哉	<b>P-165</b>
Tsuchiya, Yuki	土屋 雄揮	P-030
"	"	P-037
Tsuda, Masataka	津田 雅孝	P-082
"	"	S3-2
Tsuda, Miwako	津田 美和子	P-067
"	"	P-112
"	"	P-114
Tsudome, Mikiko	津留 美紀子	P-061
Tsukuda, Reina	佃 怜奈	<b>P-167</b>
Tsuneda, Satoshi	常田 聡	P-029
"	"	P-035
"	"	P-056
"	"	P-058
"	"	P-151
Tsunogai, Urumu	角皆 潤	P-152
"	"	<b>S1-4</b>
Tuan, Vo Quoc	"	P-126
Tzu-Hsuan, Tu	"	P-162

<b>U</b>		
Uchida, Masaki	内田 雅己	P-122
Uchida, Yoshitaka	"	P-139
Uchiyama, Ikuro	内山 郁夫	P-043
Uchiyama, Shigeru	内山 茂	<b>P-072</b>
Ueda, Masahiro	上田 昌宏	<b>S6-1</b>
Ueda, Shingo	上田 眞吾	P-146
Ueda, Yuto	植田 雄人	<b>P-075</b>
Uehara, Kent	上原 研人	<b>P-060</b>
Ueki, Atsuko	上木 厚子	P-005
Ueki, Katsuji	上木 勝司	P-005
Ueki, Shoko	植木 尚子	<b>P-244</b>
Ueno, Shun-ichiro	上野 俊一朗	P-065
Uetake, Jun	植竹 淳	<b>P-122</b>
Uga, Hiroyuki	"	P-226
Umeki, Kiyoshi	梅木 清	P-087
Umezawa, Kazuhiro	梅澤 和寛	P-100
"	"	P-146
Umezawa, Yu	梅澤 有	P-092
"	"	P-147
Unno, Hiroaki	海野 裕晃	P-128
Unno, Yusuke	海野 佑介	P-218
Urayama, Syun-ichi	浦山 俊一	P-090
"	"	P-249
"	"	<b>S4-3</b>
Ushiki, Norisuke	牛木 章友	P-035
Usui, Yasuhiro	白井 靖浩	P-133
Utami, Yuniar D.	"	<b>P-191</b>

<b>V</b>		
Vago, Imre	"	P-130
Vandamme, Peter	"	P-186

<b>W</b>		
Wada, Minoru	和田 実	P-092
"	"	P-147
Wada, Noriko	和田 典子	<b>P-205</b>
Wada, shoko	和田 祥子	P-073
Wakamoto, Yuichi	"	P-023
Wakaoji, Satoshi	若王子 智史	P-198
Wakayama, Tatsuki	若山 樹	P-161
Wang, Yong	王 勇	P-135
Ward, David M.	"	P-109
Washio, Kousuke	鷲尾 昂祐	<b>P-092</b>
Watai, Hiroyasu	綿井 博康	<b>P-243</b>
Watanabe, Hideki	渡辺 秀樹	P-080
Watanabe, Hiroki	渡辺 宏紀	<b>P-174</b>
Watanabe, Kazuya	渡邊 一哉	P-173
Watanabe, Keiji	渡邊 圭司	<b>P-098</b>
Watanabe, Kota	渡邊 康太	<b>P-210</b>
Watanabe, Miho	渡邊 美穂	<b>P-038</b>
Watanabe, Seiya	渡邊 誠也	P-046
Watanabe, Takeshi	渡邊 健史	P-129
Watanabe, Tsunehiro	渡辺 恒大	P-142
Watarai, Naoki	渡来 直生	S3-2
Watsuji, Tomoo	和辻 智郎	P-106
"	"	P-187
"	"	<b>P-188</b>
Wild, Jan	"	P-227

<b>Y</b>		
Yabuki, Akinori	矢吹 彬憲	<b>P-090</b>
Yabuta, Hikaru	薮田 ひかる	P-118
Yamada, Chika	山田 知加	<b>P-005</b>
Yamada, Masayoshi	"	P-006
Yamada, Masayoshi	山田 真義	P-011
Yamada, Mikina	山田 樹奈	P-136
Yamada, Takashi	山田 隆	P-242
Yamagishi, Akihiko	山岸 明彦	P-118
Yamagishi, Akihiko	山岸 明彦	P-119
Yamaguchi, Akira	山口 晃	S1-2
Yamaguchi, Haruyo	山口 晴代	P-095
Yamaguchi, Nobuyasu	山口 進康	<b>P-125</b>
Yamaguchi, Takashi	山口 隆司	P-138
"	"	P-157
"	"	P-137
Yamaki, Kunitsugu	山喜 邦次	P-092
"	"	P-147
Yamamichi, Masato	山道 真人	<b>S3-3</b>
Yamamoto, Akinori	山本 昭範	P-135
Yamamoto, Hiroyuki	山本 啓之	P-114
"	"	P-188
Yamamoto, Keigo	山本 圭吾	P-243
Yamamoto, Kyosuke	山本 京祐	<b>P-155</b>
Yamamoto, Masahiro	山本 正浩	S1-2
Yamamoto, Naoki	山本 尚輝	<b>P-056</b>
"	"	P-058
Yamamoto, Naoya	山本 直弥	P-158
Yamamoto, Takumi	山元 巧	P-221
Yamamoto, Tatsuya	山本 達也	<b>P-176</b>
yamamura, masayuki	山村 雅幸	P-183
Yamanashi, Yu	山梨 由布	<b>P-057</b>
Yamaoka, nozomi	山岡 望海	S6-3
Yamaoka, Yoshio	山岡 吉生	<b>S5-4</b>
Yamashita, Hiromasa	山下 洋正	P-003
Yamashita, Miyuki	山下 美雪	P-057
Yamashita, Youhei	山下 洋平	P-091

Yamato, Yusaku	大和 優作	P-030
Yamauchi, Masahito	山内 正仁	P-011
Yamazaki, Teruaki	山崎 映明	P-073
Yamguchi, Haruyo	山口 晴代	P-089
Yanagawa, Katsunori	柳川 勝紀	P-117
〃		<b>P-158</b>
Yanagisawa, Maki	柳澤 真紀	P-014
Yanagishita, Hiroshi	柳下 宏	P-015
Yano, Hajime	矢野 創	P-118
Yano, Katsuya	矢野 勝也	P-128
Yashiro, Seizo	八城 勢造	P-017
〃		P-021
Yasuda, Marina	安田 まり奈	<b>P-239</b>
Yasuda, Reiko	安田 怜子	<b>P-030</b>
Yasuike, Motoshige	安池 元重	P-097
Yawata, Yutaka	八幡 穰	P-034
Yee, SaiKiat	イーサイキヤット	<b>P-146</b>
Yohda, Masafumi	養王田 正文	P-070
Yokobori, Shin-ichi	横堀 伸一	<b>P-118</b>
〃		P-119
Yokohama, Naoaki	横山 直明	S5-1
Yokoi, Taeko	横井 妙子	P-074
Yokokawa, Taichi	横川 太一	P-090
Yokoyama, Kana	横山 佳奈	P-021
Yokoyama, Kizuna	横山 心結	P-048
YOKOYAMA, TADASHI		P-216
Yonebayashi, Eiji	米林 英治	P-161
Yoneda, Kyoko	米田 恭子	P-228
〃		P-229
〃		P-231
〃		<b>P-230</b>
Yoshida, Mitsuhiro	吉田 光宏	P-248
〃		<b>P-249</b>
Yoshida, Naoko	吉田 奈央子	P-138
〃		<b>P-177</b>
Yoshida, Takashi	吉田 天士	P-111
〃		P-233
〃		P-234
〃		P-243
〃		<b>S4-4</b>
Yoshida, Yukari	吉田 ゆかり	<b>P-248</b>
Yoshida-Takashima, Yukari	吉田(高島) ゆかり	P-247
〃		P-249
Yoshikawa, Chisato	吉川 知里	P-178
Yoshikawa, Genki	吉川 元貴	<b>P-242</b>
Yoshikawa, Hirofumi	吉川 博文	P-124
Yoshikawa, Miho	吉川 美穂	<b>P-007</b>
Yoshimura, Yoshitaka	吉村 義隆	P-119
Yoshioka, Hideyoshi	吉岡 秀佳	P-160
Yoshioka, Ryo	吉岡 遼	P-126
Yoshioka-Ikunaga, Yoko		P-045
Yoshizawa, Susumu	吉澤 晋	P-179
〃		<b>S4-5</b>
Yu, Fei	于 飛	P-246
Yuan, Kun		P-213
YUAN, KUN	元 坤	<b>P-216</b>
Yuki, Masahiro	雪 真弘	P-191
〃		<b>P-192</b>
〃		P-196
〃		P-197
〃		P-199
〃		P-238
Yuki, Morono		P-162
Yumiya, Maho	弓矢 真穂	<b>P-234</b>

## X

Zhang, Ming	張 銘	P-007
Zsuposne Olah, Agnes		P-130

## 賛助企業の紹介

### ブース展示企業

アルテア技研(株)  
エーエムアール(株)  
ジャスコインタナショナル(株)  
(株)生物技研  
(株)センシユー科学  
ChunLab, Inc.  
(株)ファスマック  
(株)マクロジェン・ジャパン  
(株)丸菱バイオエンジニア

### ポスター展示企業

(株)池田理化  
いであ(株)  
SI サイエンス(株)  
J-POWER (電源開発(株))  
新江ノ島水族館 (江の島ピーエフアイ(株))  
ZERO  
(株)テクノスルガ・ラボ  
日産自動車(株)  
日油技研工業(株)  
日本エヌ・ユー・エス(株)  
(株)ファスマック  
理科研(株)  
(株)メイズ

### 寄付企業

天野エンザイム(株)  
(株)環境総合テクノス  
(株)東方技研

### ランチョンセミナー開催企業

サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)

### 広告掲載企業

サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)  
(株)ファスマック  
アルテア技研(株)  
エーエムアール(株)  
SI サイエンス(株)  
(株)生物技研  
(株)センシユー科学  
日油技研工業(株)  
(株)マクロジェン・ジャパン  
(株)池田理化  
いであ(株)  
ジャスコインタナショナル(株)  
ZERO  
竹田理化工業(株)  
(株)テクノスルガ・ラボ  
(株)ニッポンジーン  
日本エヌ・ユー・エス(株)  
日本ジェネティクス(株)  
パナソニック ヘルスケア(株)  
理科研(株)

敬称略

平成 28 年 10 月 19 日現在

謝辞

日本微生物生態学会第 31 回大会の開催に際し、多数の企業より賛助を賜り、心よりお礼申し上げます。

大会実行委員会一同

iontorrent

# The S is for Simplicity

## Ion S5 システム誕生

次世代シーケンサによる  
微生物ゲノム・メタゲノム解析を  
もっと身近に、もっと簡単に

Ion S5™ / Ion S5™ XLシステムは、400 bpリード長で6~8 Gbの  
スループットを可能にする新型チップと、カートリッジ型試薬の採用  
により、これまでになく簡単に微生物ゲノム・メタゲノム解析が  
行える次世代シーケンシングシステムです。



### Ion AmpliSeq™ テクノロジー

1ng~ゲノムDNAからメタゲノム  
解析を可能に



### カートリッジ型試薬の採用

シーケンスのセットアップのための  
ハンズオンタイムが15分以下に



### 2.5-4時間の高速シーケンス

200bp 2.5時間、400bp 4時間の  
高速シーケンスを実現



Ion S5 システムに関する詳細はこちら

[www.thermofisher.com/ionS5](http://www.thermofisher.com/ionS5)

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。  
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。標準販売条件はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/jp-tc](http://www.thermofisher.com/jp-tc)  
For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

サーモフィッシャーサイエンティフィック  
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8 TEL：03-6832-9300 FAX：03-6832-9580

[f facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan) [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

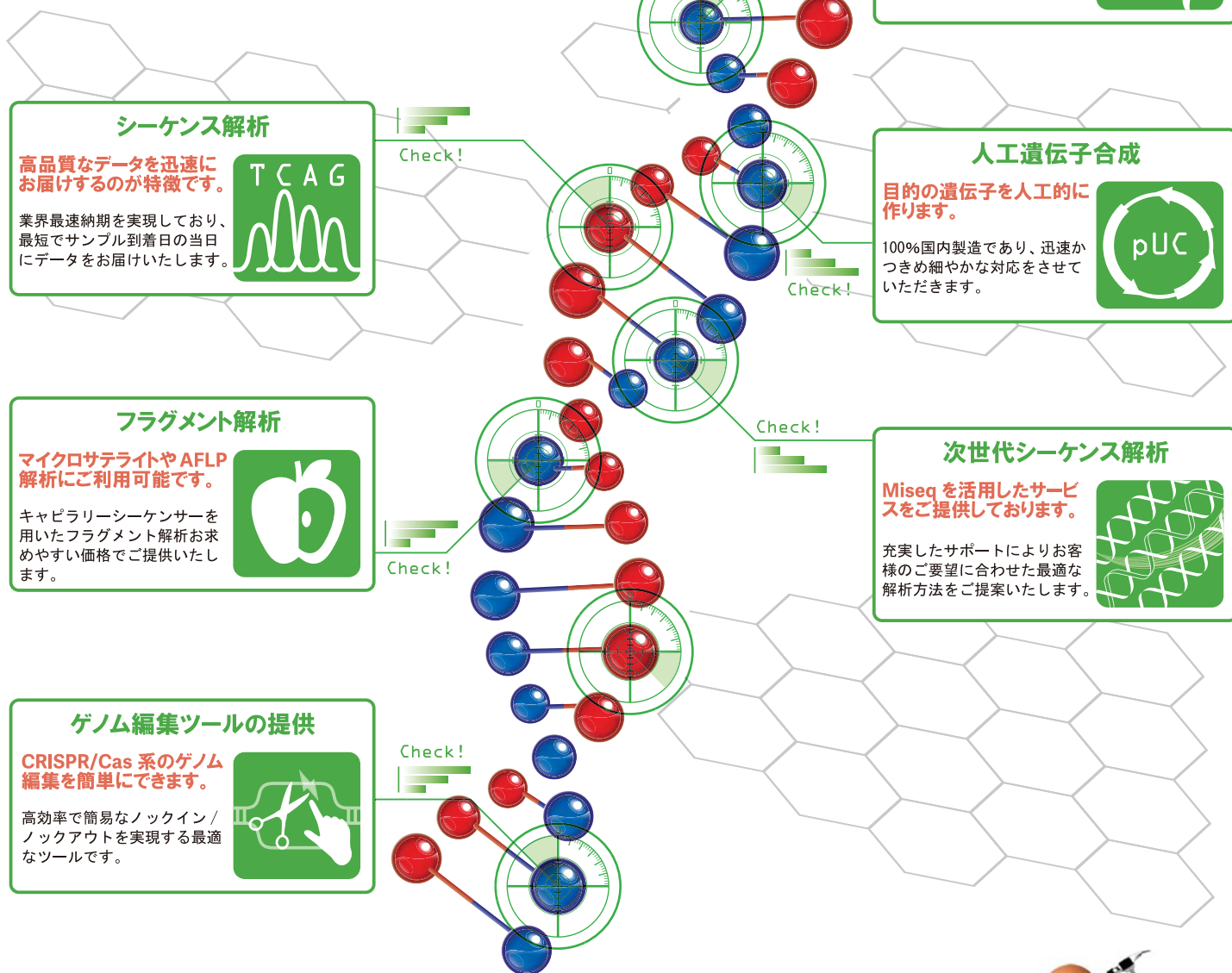
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



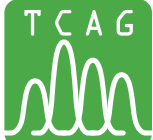
# 私たちはこんなことやっています。 今抱えている課題を私たちと解決しませんか？

お客様のお仕事の一部を承ることにより、  
お客様により早く、より良い成果を得ていただくことが、  
ファスマックの使命と考えております。



### シーケンス解析

高品質なデータを迅速にお届けするのが特徴です。



業界最速納期を実現しており、最短でサンプル到着日の当日にデータをお届けいたします。

### フラグメント解析

マイクロサテライトや AFLP 解析にご利用可能です。



キャピラリーシーケンサーを用いたフラグメント解析お求めやすい価格でご提供いたします。

### ゲノム編集ツールの提供

CRISPR/Cas 系のゲノム編集を簡単にできます。



高効率で簡易なノックイン / ノックアウトを実現する最適なツールです。

### オリゴDNA・RNA合成

徹底した品質管理を行っております。



1本1本がオーダーメイドである受託合成に必要なシステムを自社開発しております。

### 人工遺伝子合成

目的の遺伝子を人工的に作ります。



100%国内製造であり、迅速かつきめ細やかな対応をさせていただきます。

### 次世代シーケンス解析

Miseq を活用したサービスをご提供しております。



充実したサポートによりお客様のご要望に合わせた最適な解析方法をご提案いたします。

私たちのサービスは、  
あなたの発想から生まれます。

**YOU × FASMAC =**



詳しいサービス情報はWebで

FASMAC



<http://www.fasmac.co.jp>

## 株式会社ファスマック

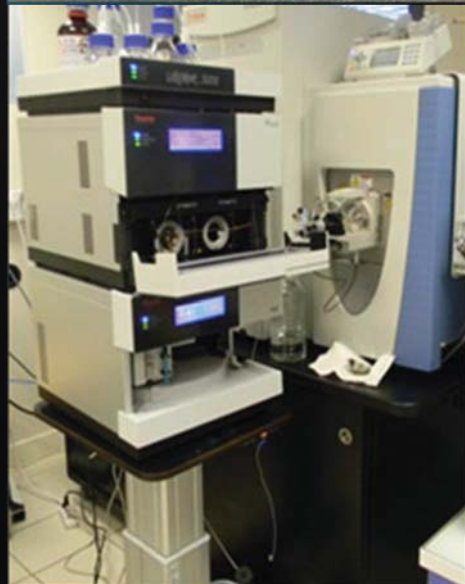
バイオ研究支援事業部

神奈川県厚木市岡田ケーオービルA棟4階

TEL 046-281-9901

Email [customersupport@fasmac.co.jp](mailto:customersupport@fasmac.co.jp)





## 電動昇降HPLCベンチ

- **4mm単位で電動昇降**  
天板高45~75cm 3つの高さ記憶機能付き
- 前後左右移動・上下稼働・転回可能
- **移動相交換が安全・容易**
- ご希望の天板サイズで製作可能
- **LCとMSの最適な接続が可能**

LCカラムとMSのイオンソース間の距離はクロマトグラムのテーリングを起こす原因になります。左写真は $\mu$ LC Thermo Ultimate 3000と Thermo Q Exactiveの接続、及びWaters Acquityと Waters TQ-Sの接続事例です。

このように位置と高さ調整を行い、LCカラムとMSのイオンソースの“距離を最短”にして、より**シャープなピーク**を得ることができます

製品名：『LC ベンチ』



アルテア技研株式会社

〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3-23-3

TEL:045-473-6211 / FAX:045-473-2884

e-mail: import@altair.co.jp

# Heat stabilization and Imaging Mass spectrometry

Heat stabilization is an additive-free preservation technology for tissue samples, which stops degradation and changes immediately and permanently.

## Sample Card



- For treatment and storage
- Inert materials Teflon foils

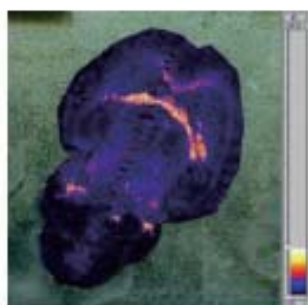
"Unequivocally demonstrated its utility in maintaining sample integrity"



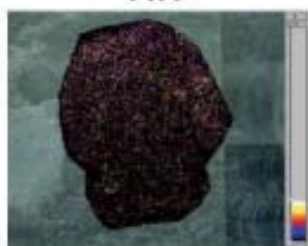
## Stabilizer T1 system

## Improve detection of small molecules: Preservation of ATP

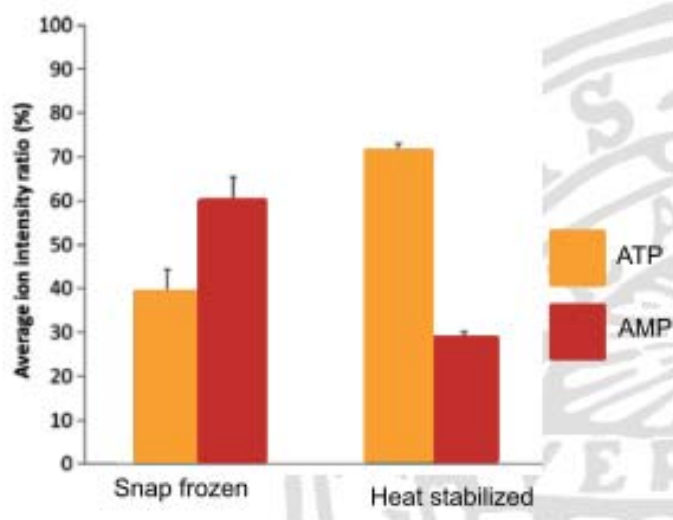
### Heat stabilized



ATP



Snap frozen



1. Maintainer card is put on Stabilizer T1



2. Maintainer could be sealed tissue sample



3. Put the start button



AMR, Inc.

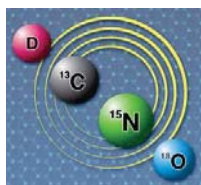
13-18, Nakane-2, Meguro-ku, Tokyo 152-0031, Japan

Tel 03-5731-2281/Fax 03-5731-2283

<http://www.amr-inc.co.jp/>







# 安定同位体標識試薬

( $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  D  $^{17}\text{-}^{18}\text{O}$ )

Cambridge Isotope Laboratories, Inc(C.I.L)

- NMR用  
アミノ酸 糖 塩安 CHL培地 NMR溶媒 ユビキチン
- トレーサー試験用  
硫安 硝酸塩 尿素 被覆肥料  $^{13}\text{CO}_2$   $\text{NaHCO}_3$  他
- メタルアイソトープ各種  
Fe Cu Ni Cr Cd Ca Na K 他
- 希ガス 及び混合ガス  
He Ne Ar Kr Xe他



<その他、下記メーカー品の販売代理店もしております。>

クロレラ工業(株)(日本)、ISOFLEX社(ロシア)、ICON社(米国)、OMICRON社(米国)

## 安定同位体受託分析

安定同位体比質量分析計(IR-MS)を導入し、安定同位体( $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  D  $^{18}\text{O}$   $^{34}\text{S}$ )の受託分析を行っています。

### ● 測定項目

$^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  D  $^{18}\text{O}$   $^{34}\text{S}$  の Natural 及び Tracer

### ● 測定機器

サーモ フィッシャー サイエンティフィック(株)製

DELTA plus XL DELTA plus Advantage

DELTA V Plus、DELTA V Advantage 他



SIサイエンス(旧 昭光通商(株)安定同位体G)は国内唯一の $^{15}\text{N}$ 濃縮メーカーです。 $^{15}\text{N}$ 標識化合物のほか、永年にわたりCIL社(ケンブリッジ アイソトープ ラボラトリーズ)の国内販売代理店として、安定同位体(SI)標識アミノ酸をはじめ様々なSI標識化合物をご提供しております。また、SIメタルやSI標識希ガスなど、安定同位体関連商材を幅広く取り扱っております。

## SIサイエンス 株式会社

〒345-0023 埼玉県北葛飾郡杉戸町本郷473-3

TEL:0480-37-1555 FAX:0480-37-1533

E-mail:isotope@si-science.co.jp

URL:http://www.si-science.co.jp/

# シ次 ー世 ケ代 ン ス 解 析

RNA  
シーケンス

10万円~

アンプリコン  
シーケンス

10万円~

イルミナ社の MiSeq と NextSeq500 を使って  
どんなご要望にもお応えします。

## RNA-Seq

発現比較解析だけではなく、  
KEGG を利用したパスウェイ  
解析や Gene Ontology も可能。  
非モデル生物にも  
対応しています。

## アンプリコン シーケンス

あらゆるサンプルの微生物  
相が解析可能です。  
真菌や原生生物、環境  
DNA の解析もできます。

## SNPs 解析

リシーケンスや RAD-seq  
でデータ所得し、変異候  
補の抽出や集団構造解析  
を行います。

## メタゲノム解析

アSEMBルしたデータを利用  
して、「①系統推定」、  
「②機能遺伝子候補の抽出  
と代謝系ごとのグループ  
分け」を行います。

株式  
会社 **生物技研**

〒243-0022 神奈川県厚木市酒井 3068 天幸第7ビル5階  
TEL 046-280-4118 FAX 046-280-4148  
URL <http://www.gikenbio.com>  
Contact [dna@gikenbio.com](mailto:dna@gikenbio.com)



嫌気性微生物培養用

# 無酸素ガス供給装置

嫌気性微生物培養用に、  
脱酸素されたガスを供給します。



SSC-9920



SSC-9910

- <装置構成>
- 脱酸素ユニット: SSC-9910
  - 供給ユニット: SSC-9920

オプション: 真空ポンプ(20L/min)

培養容器内の気相、培地を素早く、簡単に無酸素ガスで置換します。

- ・ ガス出口先端は、ルアーロックタイプになっております。  
注射針や滅菌フィルターを取り付ける事が出来ます。
- ・ 脱酸素ユニット内にある還元銅反応管は、高温でコントロールされ、  
ガス内に含まれる微量の酸素を効率よく除去します。



- ・ 還元銅の酸化度合いが目視で確認できます。

反応管内部の還元銅は還元能力が低下すると黒変します。  
このような場合は、水素ガスを通気する事で再生できます。

**ご希望による特注仕様にご対応できます。ぜひお問合せ下さい。**

一歩進んだ仕事をしたい

**SSC 株式会社センシュウ科学**

WWW.SSC-JP.com E-mail : tokyo@ssc-jp.com

本社

埼玉工場

〒167-0021 東京都杉並区井草3-31-10 大和ビル

TEL:03(3395)3251(代)

FAX:03(3395)3268

TEL:049(297)9800(代)

FAX:049(297)9803



海洋から宇宙まで

# 日油技研

日油技研工業株式会社

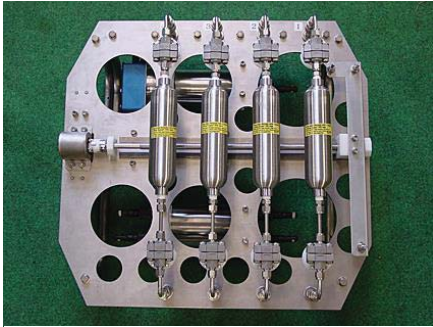
〒171-0022 東京都豊島区南池袋2-22-1

第1営業部機器グループ

<http://www.nichigi.co.jp/products.html>

E-mail: ocean-g@nichigi.co.jp 電話: 03-3986-5222

## サンプリング用機材



ROV搭載用採水装置



時系列採水器 / 現場培養装置



沈降粒子捕集装置

~~採取サンプルに 一味プラスのお手伝い。~~

## 機材管理用資材

新しい超小型RFタグが  
新しいRFIDソリューションを  
ご提案します。

非接触ICタグによるRFID技術を  
活用したサービス、システムは、  
急速に発展しています。

水にぬれても安心な  
IP67 防塵防水構造

金属対応

水圧・衝撃・耐薬性能に優れた次世代タグ

## サンプル管理用資材



温度で色が変わる！ サーモラベル



滅菌処理を確認！ 滅菌カード・ラベル



コールドチェーンの温度異常を検知！  
クリオマーク

# 遺伝子解析受託サービスなら 株式会社マクロジェン・ジャパン

## PacBio RS II HiSeq 4000 / X



PacBio RS II のバクテリアゲノム解析（アセンブルまで）  
¥204,000（税別）で実施します！

**すべての次世代機器をご利用いただけます。**



バイオインフォマティクスもご相談ください。

お気軽にご連絡ください [ngs@macrogen-japan.co.jp](mailto:ngs@macrogen-japan.co.jp)

キャピラリーシーケンス，オリゴ合成，フラグメント解析も行っております。  
詳しくは HP へ <http://www.macrogen-japan.co.jp/>



株式会社マクロジェン・ジャパン

本社・ゲノムセンター：〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町 36-1  
京都大学国際科学イノベーション棟 3F  
TEL: 075(746)2773 FAX: 075(746)2775

東京営業所：〒150-0043 東京都渋谷区道玄坂 1-15-3  
プリメーラ道玄坂 811号  
TEL: 03(5784)4350 FAX: 03(5784)4351



用途に合わせて幅広い製品をラインナップ

## スターラー／ミキサー

■手のひらサイズのミニシリーズ



IS-M02  
価格：¥22,000



IS-MB1  
価格 ¥17,000



■ホットスターラー



IS-03H  
価格 ¥49,000

■強磁力スターラー



ISS-03HP  
価格 ¥85,000

■薄型スターラー



IS-01L  
価格 ¥32,000

研究者のみなさまの、いつでもそばに…

# 池田理化オリジナル製品

マイクロピペット用チップ

## サリュートチップ salute Tip



SATP-3002

- ・汎用性の高いマイクロピペット用チップ
- ・オートクレーブ・UV照射耐性、DNase/Rnaseフリー
- ・10uL、200uL、1000uLの3種類。
- ・パルク・リフィルの2タイプ

価格：¥1,700円～

フィット感抜群の高級ラテックス製手袋

## ラテックスピュア手袋



- ・天然ラテックス製手袋
- ・パウダーフリーで、ほどよいフィット感
- ・サイズ：XS/S/M/L 100枚入り

価格：¥1,600

## 迅速に器具の乾燥を行います スーパードライングシェルフ



SD-S-IR-QD

- ・ベストセラー・
- ・ドライイングシェルフの最新モデル
- ・メスシリンダーなどの
- ガラス器具の乾燥に活躍
- ・オプションの乾燥装置を設置すれば
- 乾燥効率アップ

価格：¥85,000

※乾燥装置はオプションです



株式会社 池田理化

<http://www.ikedarika.co.jp>

本社 〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町1-8-6 神田KSビル  
TEL:03-5256-1811 FAX:03-5256-1818

八王子支店 TEL:042-642-0570  
小金井支店 TEL:0422-39-5441  
鶴見支店 TEL:045-501-5881  
横浜支店 TEL:045-983-0491  
藤沢支店 TEL:0466-54-0300  
平塚支店 TEL:0463-37-4711  
三島支店 TEL:055-975-0975  
藤枝支店 TEL:054-644-5551  
名古屋支店 TEL:052-249-8350

大阪支店 TEL:06-6136-1255  
岩国支店 TEL:0827-21-6701  
千葉支店 TEL:043-290-4055  
つくば支店 TEL:029-836-6611  
埼玉支店 TEL:049-245-7831  
高崎支店 TEL:027-320-7735  
宇都宮支店 TEL:028-610-3722  
仙台支店 TEL:022-217-7037  
札幌支店 TEL:011-208-2822

# 社会基盤の形成と環境保全の 総合コンサルタント

当社は、社会基盤整備や環境保全にかかわる企画、調査、分析、  
予測評価から計画・設計、維持管理に至る、すべての段階において、  
一貫した付加価値の高いサービスを提供しています。



代表取締役会長 田畑 日出男  
代表取締役社長 細田 昌広

## 業務内容

- ▶ 河川・港湾・空港・海岸の計画・設計・管理
- ▶ 道路・橋梁・交通・都市の計画・設計・管理
- ▶ 自然及び人工災害に係る事前・事後対策調査、計画・設計
- ▶ 環境に関する現況調査、予測、解析
- ▶ 環境アセスメント(環境影響評価)、環境保全対策
- ▶ 生物の調査、分類、同定、実験、解析、育成
- ▶ 生物生息環境の保全、再生、創造
- ▶ 理化学分析、食品分析、環境リスクの評価・管理
- ▶ 気象情報配信とバイオウェザーサービス
- ▶ 海外におけるこれらに関する業務・事業



フクジュソウ(絶滅危惧種)【植物調査】



藻類の成長阻害試験【毒性試験】



リアルタイムRT-PCR法によるノロウイルス定量分析【遺伝子分析】



タンパク質分析による食品中の食肉動物種の判定【食品分析】



クマタカ(絶滅危惧種)【猛禽類調査】



<http://ideacon.jp/>

本社	〒154-8585	東京都世田谷区駒沢 3-15-1	電話:03-4544-7600
国土環境研究所	〒224-0025	神奈川県横浜市都筑区早濑 2-2-2	電話:045-593-7600
環境創造研究所	〒421-0212	静岡県焼津市利右衛門 1334-5	電話:054-622-9551
食品・生命科学研究所 食品分析センター	〒559-8519	大阪府大阪市住之江区南港北 1-24-22	電話:06-7659-2803
亜熱帯環境研究所	〒905-1631	沖縄県名護市字屋我 252	電話:0980-52-8588
支社	大阪, 沖縄		
支店	札幌, 東北, 福島, 北陸, 名古屋, 中国, 四国, 九州		



今夜、魚たちと同じ夢を見る

～月光に漂う水族館～

# NIGHT WONDER AQUARIUM

ナイトワンダー  
アクアリウム 2016

PART-1 7.16(SAT)-9.12(MON) / PART-2 9.13(TUE)-10.31(MON) / PART-3 11.1(TUE)-12.25(SUN) 休館日 10.15(SAT) 17:00-20:00

パート2では、魚たちと一緒に見るカラフルでファンタジックな夢の世界を描きます。



新江ノ島水族館  
ENOSHIMA AQUARIUM

動物取扱業に関する表示 事業所の名称: 新江ノ島水族館 事業所の所在地: 神奈川県藤沢市片瀬海岸2-19-1  
登録に係る動物取扱業の種別: 展示 動保第120054号 登録年月日: 2007年5月10日 登録の有効期限の末日: 2017年5月9日 動物取扱責任者: 寺沢 文男



# 卓上走査型電子顕微鏡

Scanning Electron Microscope - SEM

オランダ Phenom-World社製



## proX PREMIUM II

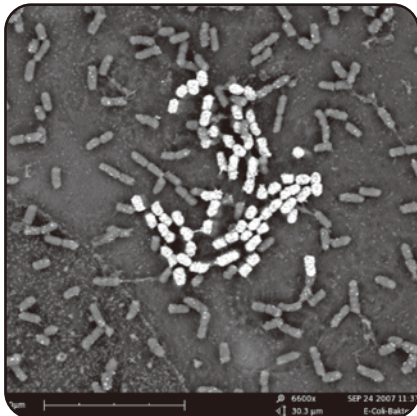
倍率：x80 ~ x130,000

シリーズ中で最高の倍率と分解能を誇る最上位機種

## 微生物の観察例

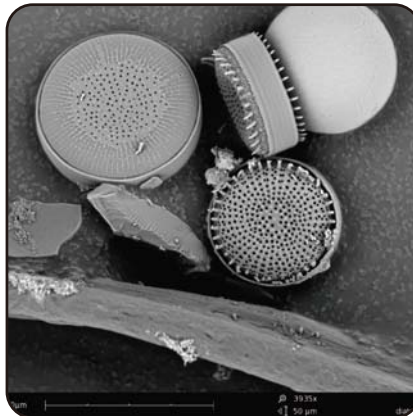
### 大腸菌

倍率：6,600倍 / 視野：30.3  $\mu\text{m}$



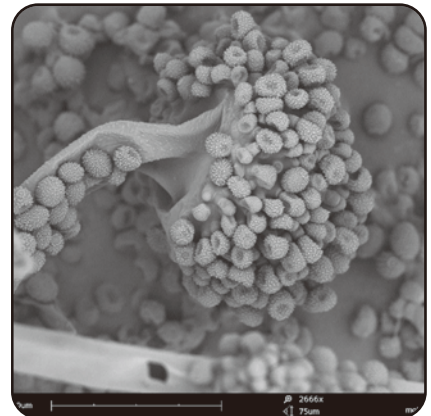
### 珪藻

倍率：3,935倍 / 視野：50  $\mu\text{m}$



### カビ孢子

倍率：2,666倍 / 視野：75  $\mu\text{m}$



ガラス  
加工

樹脂  
加工

金属  
加工

各種  
装置

単品から量産まで

# 特注理化学機器の専門店

## ガラス加工

Pxガラス・石英ガラス・プリズム 等

## 樹脂加工

アクリル・塩ビ・テフロン・各種ゴム 等



[http://www.  
zero-tsukuba.  
com](http://www.zero-tsukuba.com)



ステンレス・アルミ・チタン・カーボン 等  
金属加工

真空・熱処理・光学・制御装置 等  
各種装置

ガラス加工・樹脂加工・金属加工・各種特注装置の設計/製作

**ZERO**  
ZERO Laboratory Manufacturer

〒300-3261 茨城県つくば市花畑2-6-46  
TEL/FAX 029-864-2406

E-Mail zero\_tsukuba@ybb.ne.jp 担当者: 斎藤



信頼・実績 No.1 !

# 超純水装置 Milli-Q® Integral MT

マルチアプリケーション対応装置・バリデーション可能



水質保証付き！ Water in a Bottled

## 分子生物学用水・細胞培養用水

「水割」プランでお得にまとめて購入可能！



メルク 水割

検索



 竹田理化工業株式会社

本社 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2-7-5 <http://www.takeda-rika.co.jp>

営業本部 TEL.03(5489)8511  
 東京支店 TEL.03(5489)8521  
 西東京支店 TEL.042(589)1192  
 千葉支店 TEL.043(441)4881  
 筑波支店 TEL.029(855)1031

いわき営業所 TEL.0246(85)0650  
 鹿島支店 TEL.0299(92)1041  
 湘南支店 TEL.0463(25)6891  
 横浜支店 TEL.045(642)4341  
 三島支店 TEL.055(991)2711

埼玉支店 TEL.048(729)6937  
 高崎支店 TEL.027(310)8860  
 宇都宮支店 TEL.028(611)3761  
 延岡事務所 TEL.0982(29)3602

# 微生物試験・研究の受託サービス

「研究の時間や人手が足りない」、「解析のノウハウが無い」等々、研究者の悩みを解決。

土壌、植物、食品など、様々な試料からの微生物分離、分離菌株の分類・同定、微生物群集構造の解析など、テクノスルガ・ラボが微生物研究をお手伝いします。

## 微生物の分離

細菌、放線菌、カビ、酵母を対象として、ご指定の培養条件にて分離します。

各種条件：好気条件、嫌気条件、指定培地や指定温度による培養など

菌数測定：CFU法、PMN法など

分離菌株の抗菌性試験：ペーパーディスク法、MIC法など



## 微生物の同定試験・分類学的研究

細菌・放線菌・カビ・酵母の帰属分類群や近縁菌群を調べる試験です。DNA塩基配列解析や形態観察を組み合わせることにより、高い精度で種や近縁種が推定できます。

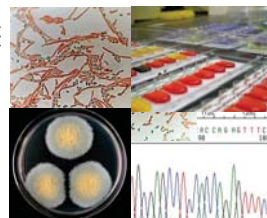
形態およびコロニー性状の観察：巨視的観察、顕微鏡観察、グラム染色、スライドカルチャーなど

生理・生化学性状試験：資化性、発酵性、各種酵素活性など

化学性状試験：菌体脂肪酸組成、細胞壁アミノ酸組成、キノン類、G+C含量など

塩基配列解析／分子系統解析：16S rDNA、28S D1/D2、ITS-5.8S、 $\beta$ -tubulinなど

DNA-DNAハイブリダイゼーション試験、PFGE、技術セミナー



## 微生物の保存用アンプルの作製

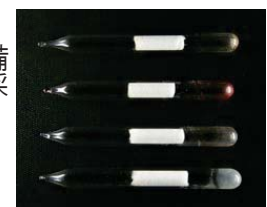
アンプルの状態では微生物を保存すれば、凍結や乾燥に弱い一部の微生物を除き、一般の冷蔵設備で30年以上の保存が可能です。アンプルによる微生物株の保存は、特許微生物の寄託機関でも採用されています。

L-乾燥アンプル作製(3本より)

アンプルカッター販売

スラント作製

凍結保存品作製(グリセロールストックなど)



## 微生物群集構造解析

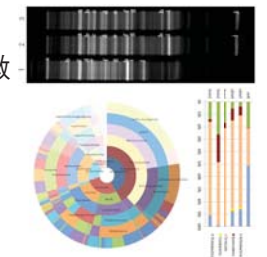
汚泥や土壌などの検体より、直接抽出した混合DNAを解析することで、多様な生物種が混在する微生物群集の構造を解析します。

PCR-DGGE／RT-PCR-DGGE：細菌、古細菌、菌類

次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析：細菌、菌類

リアルタイムPCR／特異プライマーPCR：細菌、古細菌、菌類、環境中の特定微生物群、腸内・口腔内フローラなど

蛍光染色法による菌数計数：DAPI、SYBR Green、CFDA、F420



学術研究や特許寄託など、幅広い用途にご利用いただいています。  
論文投稿応援サポートもありますので、お気軽にお問合せください。

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎330番地

Tel: 054-349-6211

Fax: 054-349-6121

E-mail: [tsl-contact@tecsrg.co.jp](mailto:tsl-contact@tecsrg.co.jp) URL: <http://www.tecsrg-lab.jp/>

368



糞便からの DNA 抽出キット

# ISOFECAL for Beads Beating

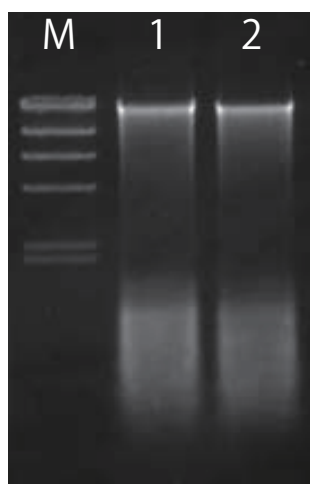
アイソフィーカル ビーズビートング用

糞便は生体試料の中でも特に夾雑物を多く含んでおり、通常の抽出方法や精製方法では夾雑物の除去が困難であるとされています。ISOFECAL for Beads Beating は、高純度の糞便 DNA を簡便かつ高い収率で抽出できるキットです。

特長

- 強固な細胞壁をもつ微生物からも DNA が抽出可能
- 高純度な糞便 DNA が抽出可能
- 得られた糞便 DNA は PCR や制限酵素反応に直接使用可能
- 約 1 時間で糞便 DNA が抽出可能

抽出DNAのアガロースゲル電気泳動



Lane M : Marker 1  
Lane 1 : 試料1  
Lane 2 : 試料2

Agarose S 1% gel  
EtBr染色

成人糞便試料各0.2 gからDNAを抽出し、その1/200量を電気泳動した。

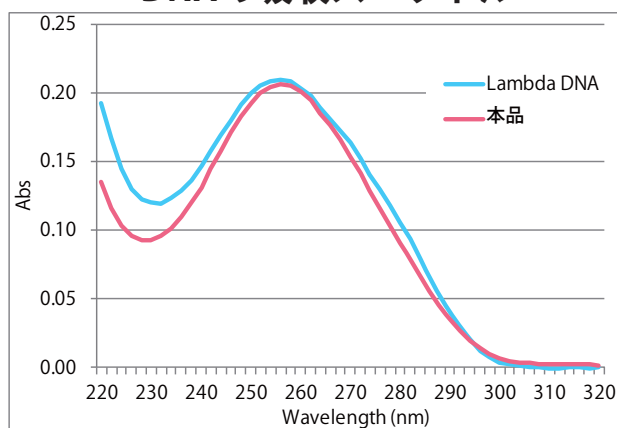
A<sub>260</sub>の値から算出したDNA収量

試料 1	133 μg/0.2 g fecal
試料 2	115 μg/0.2 g fecal

キット構成

- |                           |            |
|---------------------------|------------|
| 1. Beads Tube             | 50 本       |
| 2. Lysis Solution F       | 50 ml×1 本  |
| 3. Purification Solution  | 20 ml×1 本  |
| 4. Precipitation Solution | 40 ml×1 本  |
| 5. Wash Solution          | 50 ml×1 本  |
| 6. TE (pH 8.0)            | 5 ml×1 本   |
| 7. Ethachinmate           | 100 μl×1 本 |

DNAの吸収スペクトル



本キットを用いて抽出した成人糞便のDNAと、高純度に精製されたLambda DNAの吸収スペクトルを比較した。その結果、本キットで抽出した糞便DNAが高純度であることがわかった。

コード No.	品名	容量	DNA の抽出方法
315-06281	ISOFECAL for Beads Beating	50 回用	界面活性剤による化学的な溶菌作用と、Beads Beating による物理的な菌体破碎法の併用
318-06271	ISOFECAL	50 回用	界面活性剤存在下での加熱抽出

・ ISOFECAL for Beads Beating をご使用になるにはビーズ式破碎機が必要です。  
・ 本品は、東京大学 TLO が所有する特許のライセンスを受けて製造販売しております。

販売元 **和光純薬工業株式会社**

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号  
営業所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州  
フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806  
URL：http://www.wako-chem.co.jp  
E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

製造元 **株式会社ニッポンジーン**

〒930-0834 富山市問屋町一丁目8番7号  
Tel:076-451-6548 Fax:076-451-6547

<http://www.nippongene.com>

エネルギーと環境を考える

# JANUS

日本エヌ・ユー・エス株式会社

## エネルギーと環境に関する幅広いテーマにお応えします

エネルギー分野では特に海外原子力発電の規制・技術動向、高経年化対策、核燃料サイクル、廃止措置、放射性廃棄物、信頼性リスク評価、放射線健康影響などの原子力に関わるテーマを扱っており、国内で最も充実したデータベースを保有しています。近年では、再生可能エネルギー・新エネルギーの技術評価などについてもお応えしています。

また、環境分野では海域・陸域・大気・生物を始め、廃棄物、有害化学物質、放射性物質、さらに越境大気汚染や気候変動といった地球規模の環境問題、近年資源開発が進む深海における環境問題など幅広いテーマを扱っています。

## 最適な手法で課題にアプローチします

このような幅広いテーマについて、JANUS は文献調査、環境調査、F/S 調査、海外調査、解析・評価、拡散シミュレーション、システム開発、リスクコミュニケーション、政策支援、行政・地元対応、国際会議対応、専門委員会設置といった多様な手法でアプローチすることができます。

お客様と相談しながら、課題に最も適した手法を組み合わせでご提案し、お客様とともにソリューションを目指していきます。

## 複数の分野にまたがるテーマ、専門性が高いテーマでもご相談ください

様々な専門性をもった JANUS のコンサルタントがプロジェクトごとにチームを組んで、分野をまたいだユニークなテーマにもお応えします。どこに問題があるのか、真の課題は何なのか、どのようにすれば解決するのか、お客様とともに紐解いていきます。

また、JANUS は長年の業務を通じて国内外の様々な研究機関、学術機関などの専門家と協力関係を築くとともに、国内外のコンサルティング会社などとアライアンスを締結しています。複数の分野にまたがるテーマ、専門性の高いテーマにも幅広くお応えすることができます。

所在地 〒160-0023 東京都新宿区西新宿7丁目5番25号 西新宿木村屋ビル5階  
TEL 03-5925-6710 (代表)  
URL <http://www.janus.co.jp/>



### 超低温フリーザー (-85℃)

#### デュアル冷却シリーズ

- デュアル冷却システムでリスク回避
- WVGAフルカラー液晶タッチパネルコントローラー
- VIP PLUS・新型貯蔵ラックで収納効率アップ
- 独自のECOモードで省エネ運転  
(DC700VX:MDF-794比較 約24%/DC500VX:MDF-594比較 約23%)
- フィルター清掃不要



MDF-DC700VX (715L)  
メーカー希望小売価格 2,500,000円



MDF-DC500VX (575L)  
メーカー希望小売価格 2,100,000円

#### パーソナルユースシリーズ

- シングル冷却システムで-85℃冷却
- VIP PLUSで収納効率アップ
- 従来品(MDF-293)より約36%省エネ・省スペース
- フィルター清掃不要



MDF-DC200V (180L)  
メーカー希望小売価格 690,000円

### CO<sub>2</sub>/マルチガスインキュベーター

- 従来品より内装品80%削減 棚受けなし 収納効率向上
- WVGAフルカラー液晶タッチパネルコントローラー
- リバーシブル扉
- 2段積み設置可能
- USBメモリーへログデータ移行可能
- 約2時間半で器内除染完了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>高速ECO除染
- 安定したCO<sub>2</sub>制御
- 結露の低減

#### CO<sub>2</sub>インキュベーター



MCO-170AICUVH (165L)  
メーカー希望小売価格 920,000円



MCO-230AICUVH (230L)  
メーカー希望小売価格 1,350,000円

#### マルチガスインキュベーター



MCO-170MUVH (161L)  
メーカー希望小売価格 1,500,000円

### バイオハザード対策用キャビネット

- 前面シャッター10度傾斜タイプ
- アームレスト(別売)で作業性向上
- 可変蛍光灯カバーで手元照度アップ
- 風速自動インバーター制御
- UV灯カウントダウン表示
- UV灯紫外線強度向上(MHE-S1301A2)

#### 1300mmタイプ



MHE-S1301A2  
メーカー希望小売価格 1,480,000円

#### 900mmタイプ



MHE-S901A2  
メーカー希望小売価格 1,400,000円

●当社では製品の内容物の補償は出来ませんので予めご了承ください。  
●掲載商品の価格には、消費税・地方消費税・配送料・設置料・関連工事費・使用済み商品の引き取り費などは含まれておりません。

#### お問い合わせは

パナソニック ヘルスケア株式会社  
バイオメディカ事業部  
〒105-8433  
東京都港区西新橋2丁目38番5号

北海道営業所 TEL 011-231-7113 FAX 011-271-0714  
東北営業所 TEL 022-266-2131 FAX 022-215-5582  
つくば出張所 TEL 029-855-3407 FAX 029-855-3408  
東京営業所 TEL 03-5408-7277 FAX 03-5408-0873  
南関東営業所 TEL 045-978-5134 FAX 045-978-5150

中部営業所 TEL 052-551-0822 FAX 052-551-3490  
近畿営業所 TEL 06-6136-1415 FAX 06-6136-1449  
中国営業所 TEL 082-247-7532 FAX 082-240-2701  
九州営業所 TEL 092-292-7719 FAX 092-291-5353

ゲノム研究

再生医療

創薬

分析

研究設備

試薬・消耗品

受託

様々な  
研究用機器 /  
試薬 / 消耗品  
をご提供



私たちは、理化学機器や装置、臨床検査機器、研究用試薬、消耗器具や備品まで、研究の場に必要様々な商品を扱っています。ラボラトリーデザインも扱い、研究のための施設を位置から提案することが可能です。取り扱いメーカーは国内外 1,000 社を超え、あらゆる研究のシーンに対応しています。



理科研株式会社

www.rikaken.co.jp

- **本社** 〒463-8528 名古屋守山区元郷二丁目 107 番地  
TEL: 052-798-6151 代 E-mail: honsya@rikaken.co.jp
- **三重支店** 〒514-0103 三重県津市栗真中山町 43 番地 1  
TEL: 059-236-5511 E-mail: mie@rikaken.co.jp
- **岐阜営業所** 〒500-8225 岐阜市岩地二丁目 25 番 2 号  
TEL: 058-240-0721 E-mail: gifu@rikaken.co.jp
- **岡崎営業所** 〒444-0864 愛知県岡崎市明大寺町字西長峰 50 番  
TEL: 0564-57-1751 E-mail: okazaki@rikaken.co.jp
- **静岡営業所** 〒422-8005 静岡市駿河区池田 379 番地  
TEL: 054-208-5351 E-mail: shizuoka@rikaken.co.jp
- **東京支社** 〒113-0033 東京都文京区本郷三丁目 44 番 2 号  
TEL: 03-3815-8951 代 E-mail: tokyo@rikaken.co.jp
- **目黒支店** 〒153-0042 東京都目黒区青葉台三丁目 12 番 6 号  
TEL: 03-3477-7251 E-mail: meguro@rikaken.co.jp
- **多摩営業所** 〒187-0022 東京都小平市上水本町 2 丁目 18 番 20 号  
TEL: 042-329-8651 E-mail: tama@rikaken.co.jp
- **つくば支店** 〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3 丁目 16-2  
TEL: 029-839-1251 E-mail: tsukuba@rikaken.co.jp
- **千葉営業所** 〒260-0842 千葉市中央区南町 3 丁目 2 番 1 号 青木ビル 1 階  
TEL: 043-305-1751 E-mail: chiba@rikaken.co.jp
- **仙台営業所** 〒984-0051 仙台市若林区新寺三丁目 5 番 40 号  
TEL: 022-352-4851 E-mail: sendai@rikaken.co.jp
- **神奈川支店** 〒227-0045 横浜市青葉区若草台 1 番地 5  
TEL: 045-530-0151 E-mail: kanagawa@rikaken.co.jp
- **鶴見営業所** 〒230-0033 横浜市鶴見区朝日町一丁目 49 番地  
TEL: 045-500-4551 E-mail: tsurumi@rikaken.co.jp
- **平塚営業所** 〒254-0035 神奈川県平塚市宮の前 1 番 2 号 エアーズ第 7 平塚ビル 3 階  
TEL: 0463-79-8851 E-mail: hiratsuka@rikaken.co.jp
- **三島営業所** 〒411-0943 静岡県駿東郡長泉町下土狩 217 番地 1  
TEL: 055-980-1101 E-mail: mishima@rikaken.co.jp

