
S-001

Omics and genome-enabled technology to understand phylogenetic-based enzyme functions

高須賀 太一¹, James J. Ellinger², Szilvia K Nagy¹(¹北大・農, ²東京大・CGCS)

"The activity of enzymes can be extremely diverse in terms of the kinetics, substrate specificities, reaction optimum, and other properties even within the same protein family and shared basic structure. There are a vast majority of potentially useful enzymes in nature, which activities evolved from ancient time, yet our knowledge is extremely limited. Recent exponentially increasing genome data and robust gene synthesis technology have made it possible to examine the diversity of enzyme activities of over 100 different sequences in the same protein family. We use bioinformatics, gene synthesis, biochemical and structural approaches to assess the function of enzymes in the selected protein families. For example, our previous study focused on the bacterial glycoside hydrolase family 55, which hydrolyzes β -1,3 glucan largely found in brown algae, in order to discover enzymes that might improve a process of deconstruction of algae to biofuels. The specific activity, salt tolerance, temperature and pH optimum were tested for 46 GH55s from the phylogenetic space. A broad range of enzyme activity was determined, and we were able to pick few enzymes for the process of algae hydrolysis. Furthermore, analogous approaches have been taken for other protein families for different aspects such as to understand protein functional evolution. "

福田 真嗣(慶大・先端生命研, JST・さきがけ, メタジェン)

ヒトの腸内には数百種類以上でおよそ100兆個にもおよぶとされる腸内細菌が生息しており、これらの集団（これを腸内フローラと呼ぶ）は宿主の腸管細胞群と密接に相互作用することで、複雑な腸内生態系、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、糖尿病や動脈硬化などの代謝疾患、さらにはアレルギーや自己免疫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。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細胞の分化誘導を促すことで、大腸炎を抑制することを明らかにした。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や、加齢に伴った腸内フローラの変動が宿主の肥満や耐糖能悪化につながることも明らかにした。このように腸内フローラ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。本発表では、「腸内デザインによる健康長寿社会」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適切な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。

S-003

16S rRNA遺伝子アンプリコン解析の弱点と最新技術

関口 勇地, Dieter Tournalousse (産総研バイオメディカル)

Next-generation sequencing (NGS) of 16S rRNA gene amplicons (16S-seq) is widely used for profiling of the taxonomic composition of complex microbiota. However, methodological challenges and shortcomings of 16S-seq are increasingly being recognized and need to be addressed as the microbiome field moves forward. This includes the need to adopt rigorous quality control to ensure reproducibility within and across investigations. In this context, our group recently established synthetic 16S rRNA genes as a versatile tool for quality control in 16S-seq. Adding the sequences as spike-in controls to individual samples enables assessment of the performance of the measurements and provides quality control across 16S-seq workflows, from DNA extraction to PCR amplification and bioinformatics analysis. Other limitations of 16S-seq include the limited ability to distinguish between closely related species and poor predictability related to the functional capabilities of the detected microorganisms. Therefore, the microbiome field has witnessed a rapid uptake of novel approaches that move beyond 16S-seq. These advances will be presented in the second part of this presentation to provide a view on state-of-the-art approaches for NGS-based analysis of complex microbiota.

本公演では、生物試料の3次元観察のための顕微鏡として、この十数年の間に少しずつ普及が進んできた2光子顕微鏡と、最近発展の著しい光シート顕微鏡を取り上げ、その特徴を事例とともに紹介する。現在、3次元観察のため最も広く使われているのは共焦点顕微鏡である。しかし共焦点顕微鏡には光照射による褪色や光毒性といった試料へのダメージが大きいという欠点があり、経時観察の障害になっている。欲しいのはピントの合った面の像（光学切片）だけなのに、励起は対物レンズの焦点以外でも起きていて、そこから出た蛍光は捨てられているからである。2光子顕微鏡は、超短パルスの近赤外光を照射して、焦点でのみ起きる非線形光学現象を利用している。焦点以外での励起がないため光照射による試料ダメージは抑えられる。さらに赤外線を使う、ピンホールを要しない、等の理由により深部観察能に優れるという利点を持つ。またさらに第二高調波発生（SHG）によって、コラーゲンやセルロースといった分子のシグナルを無染色で得ることができる。一昔前はレーザー光源の調整が難しいなどの理由で利用は限られていたが、近頃は共焦点顕微鏡とほぼ同じ気軽さで使うことができるようになっている。

光シート顕微鏡は、観察用の対物レンズとは別に照射用対物レンズを置き、そこから薄いシート状に成形した励起光を照射することで光学切片を得る顕微鏡である。やはり光照射による試料ダメージは抑えられる。さらに上二者に対して圧倒的な高速性が特徴である。一方で試料は複数の対物レンズに囲まれるかたちになるため、試料マウント法は独特であり、一定の慣れが必要である。事例として、光毒性に非常に弱い哺乳類胚の原腸陥入の可視化、あまりに高速なため従来の顕微鏡では難しかったオオアメーバ (*Amoeba proteus*) 運動の3次元観察などについて紹介する。

尾花 望, 豊福 雅典, 別役 重之, Utada S Andrew, 野村 暢彦 (筑波大学生命環境系)

地球上の様々な自然環境中では細菌は集団である“バイオフィーム”を形成し、物質表面に付着して生息している。実環境中で形成されるバイオフィームは動植物における感染症のみならず、発酵食品や食品腐敗、金属腐食（バイオフィアウリング）、水処理など、様々な分野において重要な役割を担っている。微生物はバイオフィームの内部においてシグナル化合物等を用いて細胞間でコミュニケーションし、社会性を発揮することで高度に組織化された集団を形成していることが明らかとなりつつある。バイオフィームの高次構造形成には微生物が自身で産生する細胞外マトリクス（多糖、タンパク質、DNA）が必須である。バイオフィームを理解するためには分子生物学的手法による解析のみならず、その高次構造を経時的に観察するイメージング技術が不可欠である。我々は共焦点レーザー顕微鏡を用いた反射顕微鏡法を応用することによって、バイオフィームの構造とその付着表面を3次元的且つ非破壊的に解析することに成功した。さらに本手法と蛍光観察手法やマイクロデバイス技術を組み合わせることによって、バイオフィーム内部の一細胞遺伝子発現解析や、バイオフィームと様々な付着物質表面（歯面、植物および金属）の相互作用を同時に解析することが可能となった。本発表では我々の成果を中心に、種々のバイオフィームを可視化した成果を紹介させていただき、微生物の可視化技術の将来的な展望について議論する。

ウイルス研究が変わりつつある。従来までウイルス学分野では、ウイルスの病原体としてとしての側面が主に研究されてきた。それが今、ウイルスは生き物の世界を暴くための重要な研究対象であるという認識が広がりつつある。その背景には、いくつかの発見があった。多様な形態を持つ古細菌ウイルスや細胞並みの遺伝子レパートリーを誇る巨大ウイルスの存在、哺乳類胎盤形におけるレトロウイルスの家畜化、ウイルスによるイネ科植物の表現型制御、寄生バチの染色体の一部となり宿主の武器と化したウイルス起源の遺伝情報。ウイルスと宿主の関係性を巡るこれらの発見は、異分野に属する研究者らの熱い興味をも掻き立てた。一方、生物間の遺伝子移動を媒介するダークマターとも喩えられる未知の多様性を誇るウイルスが、海洋では地球規模の生物炭素ポンプの決定的な要素の一つであるとの報告が成されるに到り、新たな新学術領域研究「ネオウイルス学 (H28-32)」のスタートへと繋がった。ウイルスの真の姿・存在意義を解明することなく、生命・生態系を巡る理解を深化することは不可能なのかもしれない。とすれば、ウイルス-宿主間での共進化、共生、ならびにその存在様態の多様性という視点に立ち、ウイルスを地球生態系の構成要素として捉え精査することは有意義であると考えられる。「ウイルスによる生態システム制御学」という概念を掲げ進められつつある「ネオウイルス学」の進展に期待されたい。言うまでもなくその中では、多様な生物や幅広い環境から採取した膨大な量と種類のビッグデータを用いて、微視的な遺伝子の世界と巨視的な世界を橋渡しする複雑系研究という視点も重要である。ウイルスを非生命体とする見方もある。だが、この考え方は真の意味でウイルス理解を妨げているのではないか？ ウイルスを直接の対象とする研究からこそ、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ではないか？ 今後ウイルス研究を進展させるために、今、何に注目すべきか。本シンポジウムで意見を交わしたい。本演題で紹介するデータの一部は、新学術領域研究「ネオウイルス学 (課題番号16H06437)」の助成によるものである。

地球上に150万種以上存在する菌類に感染するマイコウイルスは多様性に富んでおり、未知なものが多く、ゲノム核酸やタンパク質の構造など分子生物学分野における基礎的な発見の宝庫と云える。私達は、主として植物病原菌から種々の新種の2本鎖RNAウイルスの探索を行ってきた。そして植物病原菌にマイコウイルスが感染すると、総じて宿主菌の生育に負の影響を齎すことが確かめられたが、一方で、マイコウイルス感染は宿主菌の病原性を弱めたり（弱毒化）、逆に強めたり（強毒化）する性質を示す事を、イネいもち病菌やアルターナリア・アルタナータ菌から見出してきた。そこで、これら新規なマイコウイルスの遺伝情報がコードする未知のタンパク質機能を明らかにすべく、モデル生物のパン酵母異種遺伝子発現系を利用した評価法を確立してきてきた。その結果、パン酵母に対して生育阻害を付与するタンパク質を選抜することができ、同じタンパク質を病原性酵母クリプトコックス細胞内で発現させた場合でも、生育阻害や莢膜多糖の形成阻害効果を有することが示された。しかし、驚くべきことに類似性を有する他種のマイコウイルス由来タンパク質は、逆に、酵母細胞に生育促進や延命効果を付与することが判明し、更に殺菌剤（抗がん剤）などに対する薬剤耐性能を獲得させる現象も見出されてきた。またカナバニン（アルギニンのアナログ化合物）に対する耐性変異菌の出現率を上昇させる、いわゆるミュートター機能をパン酵母に付与することを示唆する結果も得られた。元々、私達はイネやピーマンなど農作物に内在するエンドルナウイルスの探索と性状解析を行ってきたが、これまでは宿主植物体への影響は無いとしてきた。しかし、最近、アスパラガス疫病菌にエンドルナウイルスが感染すると、菌糸成長などに負の影響を与える結果を踏まえ、改めてイネを材料として宿主生長に及ぼす影響を調査した。その結果、驚くべきことに栽培イネではエンドルナウイルス感染により、発芽率、生長、分けつ、種子の収穫量が抑制され、しかし、2,4-D除草剤の噴霧処理では耐性能を付与する結果が得られた。以上の事より、マイコウイルス感染は、宿主体に対して、明らかに負荷を与えているようだが、薬剤処理などのストレス条件下においては、寧ろ、元気な状態に変化させているように思えてきた。まるで、“ウイルスが宿主をトレーニングする”印象を受ける。

S-008

植物に潜在感染しているウイルスの役割：ウイルスは植物の生存戦略に寄与できるか？

高橋 英樹¹, 宮下 脩平¹, 福原 敏行² (¹東北大学 大学院農学研究科, ²東京農工大学 農学部)

これまでの植物ウイルスの研究においては、病原体としてのウイルス、つまりウイルスの病原性と宿主植物の防御応答システムの分子基盤解析を軸として、研究が展開されてきた。一方近年、自然界の様々な植物の中には、ゲノム上にウイルスゲノムと相同の塩基配列を保有したり、ウイルスの潜在・不顕性感染を受けたりしているものが存在することが明らかになってきた。しかし、地球生態系に存在する約30万種の植物の生命活動におけるこれらのウイルスの役割が、十分に理解されているわけではない。ハクサンハタザオ(*Arabidopsis hallel*)は、シロイヌナズナ(*A. thaliana*)に近縁で中高山地帯に生息する多年生植物であり、複数種のRNAウイルスが不顕性感染していることが知られている。われわれは、宮城県内のハクサンハタザオ群落に不顕性感染しているキュウリモザイクウイルスHo系統[CMV(Ho)]を単離し、*in vitro*感染性ウイルスRNA転写システムを構築した。同転写システムを利用したCMV(Ho)ゲノムRNAの機能解析、並びにCMV(Ho)に不顕性感染したシロイヌナズナにおける網羅的遺伝子発現解析を通じて、ウイルスの不顕性感染の、宿主植物の生命活動への関与について考察する。

1970年代、電顕観察により、藻類細胞中に六角形または五角形の粒子構造がみられるという報告が多く成された。断面像が六角形または五角形の粒子、ということはおそらく正二十面体。藻類細胞に感染しているであろう「ウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle)」の発見は研究者たちの興味を集めた。細胞内にランダムに(時に整然と)並ぶ正多角形の集まり。多くがその姿にみとれているうち、ほどなく2種類のウイルスが単離された。淡水産ゾウリムシの共生クロレラを宿主とするウイルスと、海産ブラシノ藻 *Micromonas pusilla* を宿主とするウイルス。それぞれが研究室内で培養可能となった1980年前後から、俄然、藻類ウイルス研究分野は面白くなる。特に、ウイルスの感染過程や宿主特異性を巡る研究は興味深く、当時大学院生だった演者もすっかりその世界に魅了された。やがて、他の様々な藻類を宿主とするウイルスが世界各地で単離され、藻類ウイルス研究用の材料は随分と増えた。ウイルスの単離は、宿主藻類クローン培養を死滅させる微小因子の分離に他ならない。宿主を激しく殺すウイルス株をあえて選択し、精査することで、藻類ウイルスの姿を知ろうと研究者たちは競い合った。が、それは一側面の解析に過ぎなかった。ウイルスは宿主を許し、宿主はウイルスの感染を許す。それぞれの寛容性を有しつつ、両者は共存し続ける。ウイルスと宿主の本来の関係はそうした「共存性」にあり、しいていえば従来の藻類ウイルス研究は、「殺藻」という特殊なフェーズに過度に注目してきたのかもしれない。近年、宿主とウイルスの多様な関係性を探る上で有用な新しい技術 (FLDS法) が開発・改良され、微細藻類と平和安定的に共存するウイルスの存在が検出可能となった。ウイルスと宿主の真の関係性を解明するための研究が、今まさに始まったところである。本報では、内湾で発生した藻類ブルームに共存するウイルスに関するデータを概説するとともに、水圏をフィールドとした新たなウイルス研究のビジョンにも言及したい。データの一部は、新学術領域研究「ネオウイルス学 (課題番号16H06437)」ならびに平成29年度農林水産技術会議委託プロジェクト「農林水産分野における気候変動対応のための研究開発：有害プランクトンに対応した迅速診断技術の開発」の助成によるものである。

下等真核生物はウイルスハンティングの最前線となっている。最近のウイルス探索・性格付けの研究は、ウイルス多様性、進化の理解に大きく貢献してきた。また、同時にウイルスのコンセプトに挑戦する発見も数多くなされた。粒子の大きさ、ゲノムサイズがある種の細菌より大きなウイルス（バンドラウイルス等の巨大DNAウイルス）の発見、ハイポウイルスに代表されるような粒子を形成しないウイルスの発見等、がそれらにあたる。我々も、ウイルス学の常識を覆すようなウイルスライフスタイルを持つウイルスに遭遇する機会を得た。舞台は白紋羽病菌という植物病原性の糸状菌である。白紋羽病菌は400以上の植物に感染可能な子のう菌で、果樹をはじめとする多年生作物に大きな被害をもたらす。本菌は病原として農業上重要であるが、同時に、ウイルス宿主として、ウイルス/宿主相互作用の解析にも有用である。松本らによって、ヴァイロコントロール（ウイルスを用いた生物防除）を目指したウイルス探索が進められ、約20%の野外分離菌株にウイルスが感染していることが示された。これまでに解析されたウイルスはすべてRNAをゲノムにもち、一部が宿主菌の病原力を衰退させる。筆者は、野外分離株W1032に重複感染していたRNAウイルスの詳細な性状解析を進めた。その結果、新しい科に属する新規の2本鎖(ds)RNAウイルス(yado-nushi virus 1, YnV1)と1本鎖プラスセンス(+)RNAウイルス(yado-kari virus 1, YkV1)が分離された。YnV1は菌類dsRNAウイルスであるトティウイルスと遠縁の関係にあり、YkV1はノロウイルス等が包含されるカリシウイルス科に類縁関係が認められ、構造蛋白質遺伝子は保持しない。YnV1キャプシド蛋白質 (CP) に対する抗体を用いた免疫沈降試験から、YkV1はYnV1のCPをハイジャックし、自らのRNAとRNA合成酵素の粒子化に、そして複製の場として使っていることが示唆された。これを支持するかのように、YnV1は単独で複製可能であるのに対し、YkV1はその複製にYnV1を必要とすることが明かにされた。すなわち、YkV1はキャプシドレスの(+)RNAウイルスで、ヤドカリのように振る舞う。また、YnV1はYkV1により複製が促進された。従って、両者の間にはこれまで未報告の共生関係が成り立ち、YkV1はウイルスの概念を覆すライフスタイルを持つことが示された。本講演では、YnV1とYkV1について、明かになった点と今後の検討課題を議論する。

中原 一成 (環境省自然環境局自然環境計画課生物多様性施策推進室)

遺伝資源の取得の機会 (Access) とその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分 (Benefit-Sharing) は、生物多様性の重要課題の一つで、Access and Benefit-Sharingの頭文字をとってABSと呼ばれている。ここでいう利益には、産業利用による金銭的利益のみならず、学術的な新たな知見が生じるような非金銭的利益も含まれ、微生物学研究もその例外ではない。ABSについては、生物多様性条約の目的と条項で規定され、その国際的な実施のルールを定めた「遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する名古屋議定書」が2010年に採択され、2014年に発効されたことを受け、各国では遺伝資源の取得に関するABS法令が整備されてきている。また、我が国においても、国内担保措置として「遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する指針」が本年5月18日に公布され、22日に名古屋議定書が締結されたところである。このため、国外から「遺伝資源の利用」を目的として微生物を入手する場合には、提供国法令に基づく手続きが必要な場合があり、それに加えて国内担保措置に基づく日本国内の報告も必要となっている。本講演では、海外遺伝資源へのアクセスの一助とするため、提供国法令の整備状況を含めたABSに関する国際的な状況や、我が国の国内担保措置の概要について紹介する。

潜在的な価値を有する微生物は遺伝資源とされている。遺伝資源の取り扱いルールについて国際的に合意したのが1993年発効の生物多様性条約である。本条約の基本原則は、遺伝資源は存する国の主権的権利内にあり、遺伝資源を取得、利用する場合には国内法令に従うことである。手続き上の最低要件は、事前の情報に基づく同意 (PIC) と相互に合意する条件 (MAT) である。主に資源国の国内法令づくりの遅れと利用者の認識不足により、このルールの実施は困難であった。そのため2010年合意された名古屋議定書で、利用国における遵守と監視のルールが追加された。名古屋議定書の成立後、資源国では活発に新たな国内法令を創設したり、より強固に現行国内法を改定したりしている。また、資源国の当事者の間では、名古屋議定書に関する認識が向上し、明確な国内法令の遵守を求めるようになってきている。利用国における利用者遵守の監視には、行政的に行うものと自主的なものがある。欧州連合ではEU規則が2015年から実施されている。日本では、2017年1月に利用者遵守の行政監視規則案が発表された。EU規則では、利用者自身の責任を伴う自主遵守制度 (Due Diligence) とコレクションセンター登録簿の二重の遵守規定が特徴的である。欧州の現存コレクションセンターは、政府からEU規則基準に合致していることを認証してもらい、登録簿に記載してもらう必要がある。欧州の学会、コレクションセンター等では、EU規則に従った自主的な遵守制度確立の動きが活発である。欧州分類学施設連合や世界微生物保存組織連盟などがガイドライン等を制定し、各国コレクションセンターもそれらに準じた寄託・分譲制度を作成しつつある。今後欧州の寄託・分譲制度が米国へ波及すると考えられる。研究資金提供機関や学会等も名古屋議定書遵守の制度を策定するようになってきている。ドイツ研究振興協会 (DFG) は、現行指針を改定し名古屋議定書、EU規則に準拠した制度を検討している。このように欧米の政府機関、学会、コレクションセンターなどは名古屋議定書遵守対応を進めており、今後効率的で実行可能な自主的遵守システムが世界的に普及すると予想される。微生物研究者や微生物コレクションセンターはこのような事態を正しく認識し対応しなければならない。資源国の国内法令の遵守を基本とする考え方を持つべきであると考ええる。

1993年に発効した生物多様性条約(CBD)は、他国の遺伝資源にアクセスしたい場合は、事前にその国の政府から「事前の情報に基づく同意 (PIC)」を得ること、そして「相互に合意する条件 (MAT)」を設定することを謳っている。これは、遺伝資源利用者と遺伝資源提供国との関係であるが、当時、海外遺伝資源へのアクセスは個人のレベルでは少々荷が重すぎるという世評があった。NITEは、このような事態を解消すべくアジア微生物探索事業を開始した。これは、2002年に作成されたバイオテクノロジー戦略大綱に基づくものであり、バイオ行動計画2002の基本行動計画、詳細行動計画に沿って遂行された。2000年5月にナイロビで開催された第5回CBD締約国会議でのインドネシア（尼）政府代表者の発言をきっかけに、2000年8月に遺伝資源へのアクセスと利益配分の問題がジャカルタで議論された。更に、2001年1月に第2回の同会合があり、その後、この会合は尼とNITEのプロジェクト(PJ) 設立への話し合いに発展した。両者は、CBDに則った遺伝資源の利用はどうあるべきかを話し合い、Win-Winのスキームを模索し、2002年3月に、尼とNITEは「微生物資源の保全と持続可能な利用に関する共同研究プログラム」の覚書(MOU)を締結した。その後、1年間かけて実際のPJの内容を検討し、2003年4月に尼のLIPIとNITEは「インドネシア及び日本における菌類並びに放線菌の分類学的及び生態学的研究に関する共同研究プロジェクト」の合意書(PA)を締結した。我々は、2003年から開始したこの尼との微生物探索PJを皮切りに、2004年にはベトナム（越）と2006年にはモンゴル（蒙）と、そして2013年からはミャンマー（緬）とそれぞれMOU及びPAを締結し、各国において微生物の探索を行い、収集した微生物株は現地及びNBRCにおいて保管/保存するとともに、広く日本の企業や大学で利用され成果を出してきた。また、2005年からは日本の企業や大学の研究者と現地に赴き微生物を探索する企画も開始した。これらPJは、CBDの精神を十分尊重し、資源提供国と議論に議論を重ねて合意に至ったMOU並びにPAに則して実施してきたものであり、世界に先駆けてなされた画期的なものであった。PJは何回かの延長を重ね続したが、尼とは2009年3月に、越とは2016年3月に、蒙とは2017年3月にそれぞれPJの終焉を迎えたものの、両者のアクセスルートは開いており、いつでも展開できるようになっている。

演者は、1988年から2004年まで製薬会社に籍を置き、その大部分を菌類からの探索研究に従事した経験があるが、民間会社においては、ABSは、探索研究における大きな問題として認識されていた。これに対して、転職した2004年の段階では、博物館・関係の分類学関連施設では、ABSはおろか、生物多様性条約に関してもほとんどの研究者については直接の研究活動とは関連のないものと認識される傾向があった。それは、生物多様性条約が主に環境保全に主眼を置いたものとして理解され、生物資源の持続的利用についての側面が理解されていなかったこと、分類学における材料が「資源」として認識されることが少なかったことに主因があると思われる。また、ABSで謳われている「利益配分」の概念が、実利的な活動とはほとんど直接縁がない分類学の世界になじまなかったことにも一因がある。しかし、日本で開催されたCOP10以降は生物多様性条約・ABSが大きな関心事として取り上げられるようになった。その後、遺伝研にABS対策の専門チームが設置されたり、分類学会連合でABS関連の問題が大きく取り上げられたりして、分類学関連施設（博物館・大学研究室・国公立の研究機関など）でも、ABSは身近な問題となりつつある。国立科学博物館では、「遺伝資源のアクセスと利益配分に関する国立科学博物館の方針」が公表されており、多数の遺伝資源管理施設が関連するNBRP（ナショナルバイオリソースプロジェクト）にも、ABS推進の活動が設置される予定である。しかしながら、ABSへの本格的な取り組みには、まだいくつもの課題がある。その一つは、ABS関連の法令・事例に明るい事務サポートの必要性である。また、現場の研究者についても、まだまだABS関連の知識の普及が必要である。さらに、遺伝資源の入手先となる相手国の現場や事務サポートへの普及が十分でないことも問題である。今後は、ABSに関わるコンセプトの分かりやすい説明をともなった広報に加え、手順の明確化、形式の整備、事例集の整備などによって、分類学関連施設においてもABSはより一般的なものとなると思われる。

カルチャーコレクションや生物資源センター（以下、コレクション）は、対象とする微生物種や運営体制は各コレクションによって異なるが、微生物株の収集・保存・品質管理・提供を行うことで微生物遺伝資源の生育域外保全や持続的利用に直接関わってきた。一方、1993年に生物多様性条約が発効して以来、遺伝資源の利用から生じる利益の公正かつ衡平な配分が注目されるようになってきており、コレクションにおいても遺伝資源へのアクセスとその利益配分（Access and Benefit Sharing：以下、ABS）に関する支援が求められている。

これまでも各コレクションやそのネットワーク機関では微生物遺伝資源に関する情報の収集や情報発信について努めてきており、こうした取り組みをさらに発展させることがABS支援において不可欠である。今後、各コレクションはABS支援の取り組み方を明確にし、ABSを実践していくために必要な情報（寄託株の分離源や来歴、利用条件等）を効果的に収集・公開することが必要になる。一方、世界微生物株保存連盟（WFCC）やその他の関連する機関では生物多様性条約や名古屋議定書に合致した行動規範の策定や菌株番号のデータベース化、コレクション横断的なグローバルカタログ、論文・特許等に記載される菌株の検索ツールなどの開発も行われており、コレクションの利用者・寄託者にとってもABSに関する情報を得やすい環境が整えられるものと思われる。

現在、各国で生物多様性条約や名古屋議定書に関係する法整備が進み、ABSに関心を持つ研究者や関係者も増えてきていると思われる。一方では、まだ名古屋議定書に求められる要件に合致した微生物遺伝資源はそれ程多くない。本講演ではこうした時点におけるコレクション関係のABS対応の状況を概説し、その方向性について考察する機会としたい。

陸域面積の30%は酸性土壌であり、その約半分は農耕地として利用可能と試算されている。一方、古くから酸性土壌で硝化活性が確認されていたが、アンモニア酸化細菌 (AOB) の純粋培養におけるpHの低限は6.0–6.5で酸性環境では生育できないことから、酸性土壌の硝化を駆動する微生物の正体は不明であった。ところが好酸性型のアンモニア酸化古細菌 (AOA) *Nitrosotalea devanaterrea*が2011年に分離され、酸性環境での硝化の担い手が明らかになったかにみえた。しかしAOAの菌数が少ない土壌でも高い硝化能が認められ、酸性土壌の硝化の実態には不明な点が残った。我々は強酸性で知られる茶園土壌 (pH4以下) を調査した。その結果、土壌の高い硝化活性に対して既知のAOAおよびbeta-AOBの菌数は極めて少なかった。PCR反応に使用するプライマーは既知菌のDNA配列から設計するため、未知の菌の検出ができない場合がある。そこで、茶園土壌には未知の好酸性あるいは耐酸性アンモニア酸化菌が存在すると仮定し分離を試みた。その結果、新規なアンモニア酸化細菌TAO株の分離に成功した。TAO株は、純粋培養ではpH2-6の強-弱酸性条件に対して耐性を示した。これまでに土壌からはbetaプロテオバクテリアの2属*Nitrosomonas*と*Nitrosospira*が分離されているが、TAO株はgammaプロテオバクテリアに属していた。gamma-AOBは*Nitrosococcus*属のみが知られており、好塩性で海洋や塩湖に特有とされていた。TAO株は生理的性質とゲノムの特徴が既知菌株とは大きく異なることから新属新種として*Candidatus Nitrosoglobus terrae*と命名した。一方、このTAO株が実際に土壌で機能しているか明らかにするため、TAO株を分離した茶園土壌の*amoA*のDNAとmRNAを定量したところ、TAO株の*amoA*は、DNAとmRNAともに他のアンモニア酸化菌より多いことから、TAO株が供試土壌中で機能していることが示された。今後は土壌のgamma-AOBの分布や特徴について検討し、陸上生態系の窒素循環における役割を明らかにする予定である。

増田 曜子¹, 妹尾 啓史¹, 伊藤 英臣², 白鳥 豊³ (¹東京大・院農, ²産総研・北海道, ³新潟農総研)

古くから「麦は肥料で、稲は地力でとる」と言われるように、施肥に大きく依存する畑作とは対照的に、水田においては土壌が本来有する窒素肥沃度（地力窒素）が水稻の生育を大きく支えている。これは、水田土壌には自律的に窒素肥沃度を維持するシステムがある、すなわち窒素を土壌に供給して「土を肥やす」活発な微生物が存在することを意味している。このように水田土壌の窒素供給を支える微生物基盤は極めて興味深い研究対象であり、古くから研究が進められてきた。今日では高校教材にも記載されているように、土壌への窒素供給経路は窒素固定（窒素ガスをアンモニア態窒素に変換）であり、それを駆動する鍵微生物はシアノバクテリアや根粒菌であることが広く知られている。水田においてもシアノバクテリアが窒素固定を担い土壌の肥沃度を支えている、というのが1900年代前半からの常識であった。しかしながら我々は、水田土壌（新潟県農業総合研究所）のメタトランスクリプトーム解析によってこの既往概念を覆す発見に至った。同解析によって最も多く検出された窒素固定反応の機能遺伝子転写産物は、驚くべきことに、*Deltaproteobacteria*綱細菌に由来していた。中でも、世界的に水田土壌に優占し、鉄還元反応を駆動する細菌として知られてきた*Geobacter*・*Anaeromyxobacter*属細菌由来の転写産物が高頻度に検出された。さらに、これらに由来する、硝酸のアンモニアへの異化的還元反応（DNRA）の機能遺伝子転写産物も高頻度に検出された。これらのことから、水田土壌の優占種でありながらこれまで窒素変換への関与が全く議論されてこなかったこれら鉄還元菌こそが、窒素固定やDNRAによってアンモニア態窒素を生成し、水田土壌の自律的な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。さらに興味深いことに、鉄還元菌は水田土壌のみならず河川の底泥、畑、森林、雑草地といった土壌圏に普遍的に分布していることが示された。また、これら土壌のメタゲノム解析からも鉄還元菌のDNRAならびに窒素固定遺伝子も検出されており、本研究で見出された「鉄還元菌による窒素供給」は水田土壌だけでなく陸域環境全体における普遍的現象である可能性が考えられた。我々の発見は、水田土壌の窒素肥沃度を支える、さらには広く陸域生態系での窒素供給を支えるキープレーヤーとしての鉄還元菌の重要性を提唱するものである。

晝間 敬^{1,2}, 西條 雄介¹ (¹奈良先端大, ²さきがけ)

植物は多種多様な土壌微生物と相互作用している。共棲微生物は植物の生存戦略に欠かせない役割を担っていると考えられており、環境調和型の持続的農業に適した新技術のシーズとして高い期待を集めている。しかしながら、共棲微生物を活用していくためには、これらの共棲微生物による植物生存を助ける機能を明らかにするとともに、微生物相を野外環境下で安定に制御する技術の開発が必須である。私たちは、これまでに、野外で生育するアブラナ科のシロイヌナズナから *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) を単離し、Ct がシロイヌナズナや近縁のアブラナ科植物の根に感染しリンを植物へと輸送することでリンの欠乏した環境下で植物生長を促す共棲糸状菌であることを報告している (Hiruma et al., Cell 2016)。Ct による植物生長促進効果の発揮には植物のリン欠乏の適応反応 (PSR) を制御する転写因子である PHR1 が必要である。一方で、PHR1 とそのパラログである PHL1 が欠損した *phr1 phl1* 変異体では Ct の根における菌体量が有意に増加したことから、PHR1 と PHL1 は Ct の感染量を同時に制御していることが考えられた。そこで、PHR1 による Ct の菌体制御のメカニズムの理解を目的として、Ct 感染中に PHR1 によって制御される遺伝子群をトランスクリプトーム解析により調査したところ、防御関連に關与する遺伝子の発現が PHR1 によって正に制御されていることが判明した。その中でも、特に、アブラナ科植物が特異的に生産するトリプトファン由来の二次代謝産物経路が PHR1 によって制御されることが判明した。興味深いことに、PHR1 によるトリプトファン関連二次代謝物の制御はリン欠乏条件だけではなくリンが十分存在する条件下においても認められた。さらには、トリプトファン由来の二次代謝物の合成が欠損した各変異体においては Ct による植物生長が認められなくなる変異体や、さらには Ct が病原菌化し植物が枯死する変異体が存在した。以上の結果から、植物は PSR を介してリン欠乏時の共棲菌による植物生長促進経路を制御するだけではなく、環境のリンの濃度に関係なく PSR を介した防御関連応答を駆使し共棲菌の感染を制御することで共棲関係を維持・安定化していることが示唆された。本発表では、以上の内容を紹介するとともに Ct による共棲効果を安定化しさらには強める試みについて最新の試みの一部を紹介したい。

江沢 辰広, 河原 愛, 鈴木 芽以, 中西 夏輝, 丸山 隼人, 増田 税 (北海道大・院農学)

酸性土壌では、可溶化する Al^{3+} が根の伸長を阻害することに加え、リン酸と難溶性の塩を形成することから、植物は極端なリン酸欠乏に陥る。アーバスキュラー菌根菌（AM菌）は大部分の陸上植物と共生し、土壌中のリン酸を濃縮して植物に供給することから、植物にとってAM菌との共生は、酸性土壌への適応上、重要な戦略と言える。しかし、AM菌は人工培養できないことから、その生理・生態には不明な点が多い。AM菌の耐酸性には種間差があり、酸性土壌には限られた種群のみが定着できること、また、耐酸性種は中性土壌にも広く分布するジェネラリスト（普遍種）であることがわかってきた。耐酸性AM菌との共生により、植物の酸性土壌での生残性は劇的に向上するものの、 Al^{3+} による根の伸長阻害は緩和されないことから、AM菌は障害を受けた根に代わる養水分吸収の代替経路を提供することで宿主の生存を助けられていると考えられた。AM菌では、酵母の Al^{3+} 耐性遺伝子 $ALR2$ (Mg^{2+} 輸送体遺伝子) のオーソログが酸性環境で発現上昇するのに対し、 Mg^{2+} 要求性のタンパク質をコードする遺伝子群の発現は減少することから、AM菌の耐酸性は、酸性環境下における Mg^{2+} 恒常性の維持と関わっていると考えられた。最近、我々はAM菌が多様な菌類ウイルス（マイコウイルス）を保持していることを見出した。マイコウイルスのほとんどはRNAゲノムを持ち、垂直伝播および菌糸（細胞質）融合による水平伝播以外の伝搬ルートを持たない。愛知県、北海道、およびインドネシアの酸性土壌由来の*Rhizophagus clarus* 3菌株は、それぞれ1, 11, および7種のウイルスを保持していたが、共通していたのは*R. clarus mitovirus 3* (RcMV3) のみであった。驚いたことに、この3菌株のRcMV3のゲノムは塩基配列レベルで100%一致しており、宿主ゲノムへの挿入を疑ったものの、ゲノムシーケンスリードのマッピング解析から否定された。RcMV3と同属の*R. clarus mitovirus 1* (RcMV1) を同時に保持する北海道株を用いてウイルス複製と土壌pHとの関係を調べたところ、RcMV1の存在量はpHに関係なく一定だったのに対し、RcMV3の存在量はpHの低下に伴って増加した。RcMV3は酸性土壌を好む*R. clarus*に広く、かつ、長期間安定的（変異せずに）に保存されていること、また、酸性環境において正の選択圧を受けることから、宿主菌の耐酸性形質の発現に関わっていることが示唆される。

土壌微生物は物質循環や汚染浄化といった環境保全に寄与し、また根粒菌や菌根菌に代表されるように植物根に定着・共生して宿主植物に有益な効果をもたらすことが古くから知られている。このような土壌微生物の「環境」や「植物」に対する生態系サービスは今日の微生物生態学のポピュラーな研究対象として大きく発展している。そして、環境保全や農作物増産をねらった古今東西数多の研究が農学術の進歩に貢献してきた。一方、陸上生態系最大の生物グループである「昆虫」に直接作用する土壌微生物の有益な効果はほとんど分かっていない。土壌微生物は100万種以上が存在すると推定されており、陸上昆虫も100万種以上が知られている。陸上生態系においてこれら両ミリオンズが接触して相関することは想像に難くないが、現在に至るまで土壌微生物学と昆虫学が交わることなく、その相互作用の実態に迫る研究はほとんどない。「土壌微生物って環境や植物ばかりでなく、昆虫にも何かサービスしてないのか?」「そんな関係が分かったら学術的にも新しく面白いし、宿主昆虫の駆除や増産に利用できるシーズも得られるのではないか(植物みたいに)?」という興味から、発表者は土壌微生物と昆虫の共生系に関する研究に取り組んでいる。本講演ではその一部を紹介したい。これまでにイネ重要害虫の斑点米カメムシ(ホソハリカメムシ)について、その消化管後端部に発達する袋状の組織にBurkholderia属細菌を高密度に保持すること、Burkholderiaを母子間伝播することなく毎世代環境土壌中から獲得することを明らかにした。また興味深いことに、このカメムシはBurkholderiaを獲得できないと生残率が有意に低下し、成虫になったとしても体が矮小化した上、交尾行動が著しく減衰して次世代がほとんど残せなくなることを発見した。さらに、カメムシがBurkholderiaを獲得できる土壌とできない土壌があり、共生成立の可否は土壌中のBurkholderiaの密度に依存すること、そしてそのBurkholderiaの密度は土壌理化学性のあるパラメータによって規定される可能性が高いことを見出した。以上の結果から、土壌微生物が害虫カメムシの生存・繁殖において極めて重大な影響を及ぼすこと、そしてカメムシにとってまさに死活問題となる共生成立の可否は生息域の土壌微生物叢に委ねられていることが示唆された。

和田 崇之¹, 吉田 志緒美^{2,3}, 柳井 徳磨⁴

(1長崎大・熱研・国際保健, 2長崎大・医歯薬・国際保健, 3国立病院機構・近畿中央胸部疾患センター, 4岐阜大・応用生物・獣医病理)

抗酸菌属 (Mycobacterium) は、土壌や水など、多様な自然環境に生存する一方、病原菌としての側面を持ち、ヒトを含めた動物の内臓や皮膚に感染して肉芽腫などの病変を起こす。このうち、ニッチを感染宿主のみに依存する結核菌群に反して、自然環境に生存しながら動物への感染性を発揮する抗酸菌種の生態学的知見は乏しく、飼育動物での事例報告に留まっているのが現状である。こうした「自然環境から動物宿主へとニッチを移行しつつある抗酸菌種」の危険性、生存戦略、生態をどのように評価すべきであろうか。抗酸菌感染症の病態は宿主側の過剰な免疫応答によるものであり、宿主への定着や毒素産生のような一般的な感染病理メカニズムと異なっている。強固な細胞壁を持ち、様々な環境変動において死滅することなく生き延びる抗酸菌は、侵入した宿主内の免疫攻撃下においても緩やかに増殖し、感染個体の生命を脅かす。こうした「あやふやな」病原性を理解する上で不可欠なアプローチは、病理学的知見に基づいた病変から分離された微生物が起病性を持つことの証明、すなわちコッホの4原則を確かめることである。そのためには、獣医病理学を基礎とした感染診断、そこからの培養を成功させる分離技術に加え、動物感染実験に基づく再検証が求められるだろう。こうして得られた知見は、ヒト由来株との性状・ゲノム比較を通して獣医学領域から医学的応用へと結びついていく。本発表では、こうした理念に基づく具体的な研究として、演者らが経験した抗酸菌症の分析例をいくつか紹介し、本菌属の持つ「嫌らしさ」を共有したい。

中西 典子, 田中 忍, 有川 健太郎, 岩本 朋忠 (神戸市環境保健研究所・感染症部)

レジオネラは土壌・淡水環境中に広く生息している細菌である。ひとたびヒトに感染すると肺胞マクロファージに感染・増殖し、最終的に重篤な肺炎（レジオネラ症）を引き起こす。レジオネラ症は、温泉や公衆浴場の循環式浴槽などを原因とする散発的なアウトブレイクにより、しばしば社会的にも注目されている。神戸市では、生活衛生関係業務の一環として、冷却塔水や温泉等の浴槽水など水環境中のレジオネラ検査を計画的に行うことで公衆衛生対策につなげている。当研究所では、2003年から現在まで、種々の生活環境から約1,600株のレジオネラ菌株を蓄積してきた。レジオネラのヒトへの感染源、感染経路、病原性を理解するためには、環境中でのレジオネラの生態を知ることが重要である。そのため、我々はこれまでに蓄積された *L. pneumophila* において、冷却塔水由来に特徴的な三つの clonal complex が定着していること、温泉環境における多様な遺伝子型が存在していることを明らかにした。さらに、温泉環境に特徴的な菌種 の存在も見出した。病原性に関しては、遺伝子の水平伝達に寄与すると考えられている病原性遺伝子 *lvh* 遺伝子や宿主への侵入・増殖に関与する *rtx* 遺伝子の保有株の存在を見出しており、レジオネラ属菌が生態系の中でのニッチを獲得し、病原性を高める方向に進化できうることを示唆した。本シンポジウムでは、これまでの研究成果を紹介し、レジオネラ属菌の生態と病原性との関連性について考察したい。

本発表は、つつが虫病に関する2つの研究成果を示しながら、ツツガムシという小さなダニが引き起こす奇妙な感染症の知られざる世界を紹介することを眼目とした。

つつが虫病は、リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*, Ot) を保有するツツガムシ幼虫にヒトが刺されることにより発病する熱性発疹性疾患である。国内では年間300~500例が報告されており、北海道を除く都府県で発生している。つつが虫病に対しては、テトラサイクリン系抗菌薬が著効を示すため、患者は早期の治療により軽快するが、治療の遅れにより一部が重症化し、時として死に至る。

国内で知られている120種類以上のツツガムシのうち、本邦の6種類のOt血清型を媒介するのは数種類のみである。具体的には、フトゲツツガムシが Gilliam, Karp型、タテツツガムシが Kawasaki, Kuroki型、アカツツガムシが Kato型を媒介する。残るShimokoshi型は長らく媒介種が不明であったが、近年、ヒゲツツガムシが媒介種として示されている。本発表では、Shimokoshi型つつが虫病患者発生地域で採集した体長約0.2mmの2600匹のツツガムシ幼虫の中から、Shimokoshi型Otの媒介種を探し当てた演者らの地道な努力の結果を示す。

つつが虫の発生状況を観察していると、「年ごとに患者数が変動するのはなぜか？」という疑問に思い至る。例えば、春のつつが虫病患者が約9割を占める山形県では、過去30年間の春の患者数が最大20人、最小2人と10倍の開きがあった。これに関して演者らは、「ツツガムシの数が気象の影響を受けて増減することで、年ごとのつつが虫病患者数が変動する」との仮説の下、山形県における春のつつが虫病患者数と気象因子の関連性を検討した。結果、前年7月から当年3月までの各種気象因子と春の患者数との間に関連性が見出された。発表の2つ目の柱として、当該研究の概要、および得られた成果から派生したアウトリーチ活動(つつが虫病予防啓発活動)を紹介する。

つつが虫病は、現代でこそアジア・オセアニアでの流行が確認されているが、日本では少なくとも江戸時代から発生し、明治・大正・昭和期の日本人研究者が原因病原体を解明するという偉業を成し遂げた感染症である。そのような歴史あるつつが虫病に関して、平成における演者らの研究の一端を聴衆の皆さまと共有できれば本望である。

中村 寛海¹, 田口 真澄², 阿部 仁一郎¹, 高倉 耕一³, 板野 泰之⁴, 井口 純⁵, 西川 禎一⁶

(¹大阪健安研・微生物課, ²大阪健安研・研究企画課, ³滋賀県立大・環境科学部, ⁴大阪市環科研, ⁵宮崎大・農学部, ⁶大阪市大院・生活科学)

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は環境中に広く存在する細菌の一種であり、ヒトに致死率の高いリステリア症を引き起こす。本菌は古くから人畜共通感染症の原因菌と理解されていたが、1980年代に食品を介して感染することが広く認識されるようになった。現在ではヒトへの感染は99%が食品に由来すると考えられている。ナチュラルチーズや食肉製品はリステリア症の原因食品としての報告が多く、最も注意すべき食品であるとされてきた。しかしながら、近年ではこれらの食品に加えて、カンタループメロン、冷凍野菜、アイスクリームなど原因食品も多岐にわたっており、その原因の一つとして製造・加工工程における二次汚染が食品への汚染経路として重要であることがわかってきた。我々は、食品製造施設における汚染調査の結果から、最終製品から高頻度にリステリアが検出される施設においては、施設内からも高率に本菌が分離されること、また、最終製品および施設由来株の血清型や遺伝子型は一致しており、同じタイプのリステリアが長期間にわたって検出されることを実際に確認した。リステリアの施設定着要因を探るため、施設から分離されたリステリア菌株のバイオフィーム形成について調べ、施設内から高頻度に分離される株はバイオフィーム形成時に消毒剤抵抗性が増すことを明らかにした。また、細胞内寄生細菌であるリステリアが自由生活性アメーバに捕食され、アメーバと共生することによって施設内で様々な環境ストレスに抵抗して存在している可能性を知るために、食品製造環境における本菌と自由生活性アメーバとの検出状況を調べたので、これらの知見についても紹介する。

バクテリアの種間の多様性及び種内の多様性は、主にゲノム配列の違いに起因する。ゲノム中のDNAの数塩基の変化が薬剤耐性を引き起こす例や、病原性タンパク質をコードする遺伝子を持ったバクテリオファージがゲノムに組み込まれることで、無害な大腸菌株が食中毒を起こすようになった例など、ゲノム配列の多種多様な変化が多様化に関わっていることが明らかになっている。一方、ゲノムDNAのA、T、G、Cの配列の変化だけでなく、メチル化による修飾状態の変化、すなわちエピゲノムの変化も、バクテリアの多様性を生み出すことがわかってきた。病原菌が多くのDNA修飾酵素遺伝子を獲得することでエピゲノムを変化させている事例や、エピゲノムの変化による成長速度などの形質への影響も報告されている。このため、ゲノムの多様性だけでなく、エピゲノムの多様性を理解することで、種の適応進化のメカニズムをより深く理解できると考えられる。本講演では、種内のゲノム中のDNAメチル化状態（メチローム）の多様化を検出した例として、PacBioシーケンサーを用いたピロリ菌のメチローム比較解析について紹介する。ピロリ菌の各株が保持しているメチル化酵素遺伝子は数も種類も多様であることがゲノム比較解析から判明し、実際のメチローム状態を測定したところ、近縁株間でも大きく異なっていることがわかった。また、メチローム状態が変化することで、細胞内のトランスクリプトーム状態も変化することも確認した。これらの結果から、エピゲノム（メチローム）の多様性が適応進化を促進している、とする「エピゲノム駆動適応進化」仮説を提唱した。現在このメカニズムを応用し、多様なメチル化状態を人工的に創出するメチロームライブラリを作成し、DNAメチル化による遺伝子発現制御のメカニズムについての解析を行っている。高出力シーケンサーによるゲノムワイドな塩基修飾の検出手法の現状についても述べる。

我々の生活空間は、これを取り巻く空気を含めて様々な微生物で満ち溢れている。古来より、我々はこれらの微生物を偶然に、そして選抜、育種し、発酵食品を含め多彩な用途に利用している。その一方で、この生活空間には、病原性をもつ微生物も生息しており、ときとしてこれらが疾患を引き起こすことがある。これは、生活空間を多様な方法で除菌・殺菌を行ってきた先進国も例外ではない。宇宙船内のような閉鎖系居住空間や病院における集中治療室において、通常的环境下では優占種にならない特定の細菌種が増殖するように、近年先進国特異的な病原細菌が知られるようになってきている。この事実は、我々の身近な生活空間においても、どのような衛生微生物学的なリスクが存在するかを把握する重要性、および、生物学の実験室のみで行われている検査（特にどのような微生物種が存在するのか）をDNA配列レベルで把握する必要性を示している。最近になって、Oxford Nanopore社のMinIONのような携帯型DNAシーケンサーが登場し、南極や宇宙でもDNA配列の決定が可能であることがニュースで取り上げられている。このことは、DNA配列決定が我々の日常生活の一部となる可能性が広がっている。しかしながら、このDNA配列決定が生活の一部となるには、DNA抽出を含む、その他の多くの実験操作が必要である。そこで、本講演では、DNA配列決定が我々の生活、そして文化の一部になりうるのか、携帯型DNAシーケンサーとそれに付随する実験機器と操作について調査した結果と、実際に応用した結果、どのような用途には使用可能かを考察する。そして、生活の一部とするための前段階として取り組んでいるプロジェクトと応用計画について概説し、DNA配列決定を生活の一部とするためのロードマップを示す。

土壌生成・形成過程で関与する多様な微生物が複雑な土壌生態系で果たす役割を理解することはかなり困難である。従来の土壌微生物研究では、分離培養できた微生物を主に対象としてきた。しかし、培養可能な土壌微生物は非常に少なく、実際にはほとんどが培養困難であるため、それらが土壌環境中で発揮する生命現象の実態は明らかとなっていない。サンガー法による塩基配列決定法から高速に遺伝子の塩基配列を読み出せる次世代シーケンサーによる塩基配列解析技術の開発、さらに分子遺伝学的な手法やバイオインフォマティクス（データマイニング）の急速な発展により、未知・培養不可能な微生物であっても環境中から直接抽出したDNAやRNAの網羅的な塩基配列決定を進めることで遺伝子構成や転写発現を知ることができるようになった。また、次世代シーケンサーの性能向上にともなってゲノム解読が進むことで微生物の包括的な特徴づけが可能となり、微生物の機能遺伝子に関するデータベースが充実してきた。近年、土壌DNA・RNAの遺伝情報と土壌とを結びつけて、微生物がもたらす土壌機能を解き明かそうとしている。本シンポジウムでは、次世代シーケンサーを利用した2つの土壌環境ゲノム解析の研究例、2000年の三宅島雄山噴火で放出された火山灰の堆積物において植生遷移によって新たに形成された土壌層と環境保全型農法によって人為的に管理された畑地土壌に形成された多階層的構造をもつ土壌団粒の微生物群集構造解析について紹介したい。土壌環境適応と構成された微生物群集との関係性がメタゲノム遺伝情報解析から見えてきた。

木村 凡 (東京海洋大・院・食品生産)

次世代シーケンサーの登場した約10年前当初から、次世代シーケンサーがライフサイエンスの分野で画期的な進展をもたらさだろろうという事は予想されていた。食品微生物学分野も例外では無い。食品微生物学分野に次世代シーケンサーのもたらす技術革新は、コロニーからのゲノム配列の決定と、食品から直接ゲノムを抽出するメタゲノムの2つに大別することができる。どちらの技術も食品微生物学分野において大きなインパクトを与えていくことは間違いない。ただし、すくなくとも、過去10年間の進展を見ると、特にコロニーからのゲノム配列の研究の進展が著しい。特に食中毒細菌の分子疫学分野における応用が著しいスピードで行われている。3年前に登場したcg(core genome)MLSTなどの登場がもたらすインパクトは計り知れないものと考えられる。これらの技術により得られた情報は、世界のどこでも誰もが共通の言語として同じ尺度で使用できる可能性がある。このような技術は単に食中毒の分子力学的解析に応用にとどまるだけではなく、食品産業界にも広く応用できる。一方メタゲノム解析については次世代シーケンサーが登場した10年前にすでにその技術の根幹は提案されていた。特に16Sメタゲノム手法により、これまでの培養法に比べると格段のスピードで、細菌叢を解析できることが可能となった。しかし食品安全面で考えると、コロニーベースでのゲノム配列がもたらす急速な世界の変化に比べると、これまではメタゲノムの食品微生物学分野にもたらすインパクトは限定的であった。その理由として、食品の安全性においては、むしろ多数の細菌の中の少数の有害菌を特異的に検出することの方が優先される。それを可能とする手法としては、リアルタイム定量PCR法など優れた技術が、過去20年間ですでに食品産業界に導入されている。しかし、メタゲノム手法には、培養をすることなしに微生物相を解析することができるという圧倒的な利点がある。16Sメタゲノム手法は、今後食品の安全性の解析において、もしくは食品の品質評価において、大いに活用できる可能性は高い。メタゲノム解析は、食品や食品工場において未知の現象に遭遇した際に、細菌叢を瞬時に明かにすることができるという大きな強みを持つからである。

近年、薬剤耐性菌による難治性感染症が世界の公衆衛生上の重大な問題となっており、抗菌薬治療が困難な *Enterococcus faecium*、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)、*Acinetobacter baumannii* (アシネトバクター・バウマニ)、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Escherichia coli* (大腸菌) は、それぞれの頭文字を取り、"ESKAPE"病原細菌と称されている。特に2000年代に急激に進化を遂げたカルバペネム系抗菌薬耐性を含む多剤耐性のグラム陰性菌は、感染症の治療に有効な抗菌薬がほとんど無く、人類は危機的な状況に置かれている。MLST (multilocus sequence typing) による分子疫学的分類において、肺炎桿菌のST258 (sequence type 258)、アシネトバクター・バウマニのST2、緑膿菌のST235、大腸菌のST131などは日和見感染症の起因菌ながら同一クローンが世界中に拡散していることが明らかとなっている。流行株はしばしば伝達性プラスミド、バクテリオファージ、インテグロン、トランスポゾンなどの可動性遺伝因子によって"多剤耐性"を獲得しており、感染症の治療が難しい。そのため、現時点での臨床における細菌感染症を真に理解するためには、最新の臨床分離株を用いて、実際に問題となっている"high-risk"クローンの遺伝的特性を詳細に解析することが重要である。我々は、アシネトバクター・バウマニにおいて国内外の臨床分離株の比較ゲノム解析を行い、流行株 (ST2) に特異的に存在するVI型分泌機構 (T6SS: type VI secretion system) 関連遺伝子領域を発見した。グラム陰性菌の約1/4が有しているT6SSは、バクテリオファージの細菌に対するDNA注入機構を起源としており、分泌装置を標的細胞に物理的に注入可能で、真核細胞と細菌の双方を標的とする。T6SS陽性菌は、細胞障害性のあるVI型分泌タンパク質を有する場合には、その細胞障害性を阻害する免疫タンパク質を同時に有しており、自己同士または遺伝的に近いクローン同士は競合しない。我々は、アシネトバクター・バウマニのST2は細菌を標的とする細胞障害型の新規VI型分泌タンパク質を有しており、同種間および異種間の競合に極めて強く、薬剤耐性遺伝子や細菌毒素遺伝子など有用な遺伝子を染色体上に集積させていることを見出した。本演題では、薬剤耐性病原細菌の流行株が生まれる分子機構に関して、T6SSとその分泌タンパク質に注目して紹介したい。

プラスミドは今や分子生物学分野の研究には欠かせない道具であり、物質生産などの現場でもタンパク質の大量発現のため頻繁に使用されている。しかし多くの場合、宿主にプラスミドを安定に保持させるためには、プラスミド上の耐性遺伝子に対応する薬剤を培地に入れておかなければならない。この場合の「プラスミドの安定性」とは、プラスミドの複製・分配時における細胞内での安定性だけでなく、複製・分配の失敗に伴い生じたプラスミド脱落株を含む複数の株が存在する集団中で、プラスミド保持株が生き残れることも意味している。もし宿主にプラスミドを安定に保持させることができれば、薬剤を使わない培養法の開発にも繋がる可能性がある。しかしそのためには、プラスミドが宿主に与える影響を明らかにし、プラスミドの何が宿主に負荷を与えてしまうのかを理解する必要がある。私達はこれまで、原油に含まれる含窒素芳香族化合物であるカルバゾールの分解プラスミドpCAR1をモデルとして、複数の*Pseudomonas*属細菌を宿主に用い、トランスクリプトーム、プロテオーム、表現型解析を行うことで、各宿主がpCAR1を獲得した際の変化を多角的に評価してきた。その結果、*P. putida* KT2440株、*P. aeruginosa* PAO1株、*P. fluorescens* Pf0-1株と比較すると、pCAR1保持に伴う宿主染色体上遺伝子の転写変動が大きいほどpCAR1保持に伴う負荷が大きい（pCAR1保持株と非保持株とを競合培養した際に、淘汰されてしまうpCAR1保持株の割合が多い）ことを明らかにした。しかし最近、*P. resinovorans* CA10dm4株を宿主とした場合に、pCAR1だけでなく様々な分解プラスミド、薬剤耐性プラスミドを保持させても、プラスミド保持株が競合培養で淘汰されないことを見出した。本発表では*P. resinovorans* CA10dm4株の特異な性質を紹介するとともに、本菌がなぜプラスミド保持に伴う負荷を受けないのかについても考察する。

諸星 聖^{1,2}, 松浦 克美¹, 春田 伸¹ (¹首都大・生命, ²(株)テクノスルガ・ラボ)

捕食はあらゆる生物階層において最も共通的な生物間関係の一つである。細菌界においても「細菌を捕食する細菌」が存在し、系統的に多様な細菌が捕食細菌として報告されている。捕食細菌には、細胞外に分泌した溶菌酵素により被食細菌を溶かし、その内容物を自己の栄養とするものと、被食細菌の細胞内に侵入し細胞内で増殖するものが知られている。一方、被食細菌の捕食細菌に対する対抗戦略については知られていなかったが、最近、*Bacillus*属細菌が捕食細菌を感知して抗生物質を分泌し胞子形成することが報告された。しかし、捕食からの回避反応として最も想像しやすいのは細胞運動による「逃避」であるが、捕食者を察知して逃げる細菌についての報告はなかった。我々は、温泉微生物群集内の種間相互作用を研究する中で、光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* の運動性が、他菌の分泌するプロテアーゼにより変化することを見出した。*C. aggregans* と共存するプロテアーゼ生産菌は、*C. aggregans* の細胞を溶菌し、捕食・増殖する。本講演では、*C. aggregans* の溶菌作用からの逃避行動を紹介する。*C. aggregans* の運動の方向性に対するプロテアーゼの影響を評価するため、試験管に、寒天培地、*C. aggregans* を懸濁した寒天培地、プロテアーゼを含む寒天培地を順に重層し、*C. aggregans* の移動を観察した。プロテアーゼ層に近接した細胞は一部、溶菌するものの、時間経過に伴って、*C. aggregans* の細胞がプロテアーゼ層から離れるように底面側に移動することが観察された。プロテアーゼによる *C. aggregans* の運動性の変化を顕微鏡下で観察すると、運動速度に影響は見られないものの、方向転換の頻度が増加することがわかった。この方向転換頻度の増加により、プロテアーゼから遠ざかる方向への運動に偏りが生じたと考えられる。細菌の細胞運動は、捕食者からの逃避戦略にも有効であると考えられた。*C. aggregans* とその光合成産物を狙う捕食者との追いかっけが、微生物生態系内で行われていると予想される。この逃避行動のメカニズムの詳細はまだ明らかになっていないが、プロテアーゼは捕食細菌が分泌する主要な溶菌酵素として知られるため、プロテアーゼからの逃避行動は広く細菌界にみられる可能性がある。これらの種間相互作用は集団の種数、種構成、存在比に影響を与えるばかりでなく、捕食戦略および防御戦略の共進化を引き起こしているかもしれない。

加藤 広海, 小川 なつみ, 大坪 嘉行, 永田 裕二, 津田 雅孝 (東北大・院生命)

1 gあたりの土壌には数千種以上の微生物種が棲息しており、地球上で最も微生物の多様性に富む環境である。このような莫大な多様性を持った微生物コミュニティは、各役割を持つ微生物が単体として独立に機能するのではなく、共存する微生物間で互いに関わり合いながら、環境汚染物質浄化などの様々な土壌機能を支えていると予想されている。我々はこれまでに、汚染に対する土壌遺伝子プールの変動様式をメタゲノムのアプローチで解析してきた。その結果、(1) 主たる分解菌以外の細菌群に大きな変動がみられたこと、(2) 難分解性汚染物質の分解菌は優占化せず、分解に直接関与しない非分解菌がコミュニティ内で優占していたこと、を見出してきた。この結果は、数的にマイナーな分解菌（キープレイヤー）と、直接的には分解に関与しない大多数の優占菌（オーディエンス）の間で何らかの相互作用があることを示唆している。そこで我々はさらに、集積培養を介して取得したコンソーシアムを対象とすることで、メタゲノム解析で提起された問題（キープレイヤーとオーディエンスというコミュニティ構造にどのような利点があるのか、どのようなメカニズムによってそれが成立し得るのか）を実験的に検証することにした。本発表では、*Burkholderiaceae*を非分解菌とする2つの分解コンソーシアムについて明らかになったことを紹介する。分解菌*Mycobacterium*と非分解菌*Burkholderia*を含むフェナントレン分解コンソーシアムでは、フェナントレンによる分解菌の生育阻害が非分解菌の存在によって緩和されることが見出され、この現象は増殖能力のある非分解菌の細胞が分解菌に直接的に接触することで発揮されることが明らかとなった。また分解菌*Sphingobium*と非分解菌*Cupriavidus*を含む γ -HCH (hexachlorocyclohexane) 分解コンソーシアムでは、寒天培地上の分解菌のコロニーに対して非分解菌が指向性を持ってコロニー伸長することで、積極的にコンソーシアムを形成し得ることがわかった。これらの現象を通して、コンソーシアムのキープレイヤーがどのように周囲のオーディエンスと相互作用するのかを議論したい。

佐藤 由也, 稲葉 知大, 堀 知行, 羽部 浩 (産総研・環境管理)

複雑な微生物生態系からなる活性汚泥の中では、原生動物による細菌の捕食に加え、細菌間での捕食も起きている。このような捕食現象が、汚泥中の菌叢を大きく変えるだけでなく、廃水処理の効率や処理施設の維持管理に様々な影響を及ぼすと考えられる。近年の次世代シークエンサーの登場により、微生物群集の高解像度ダイナミクス追跡が可能となり、汚泥中での捕食現象についても、その一端を解析することができる。例えば、化学工場から排出される「有機物が少ない」かつ「高濃度ハロゲン化物イオンを含む」特殊な廃水を処理する活性汚泥について微生物群集構造解析を行ったところ、製品化合物の骨格となる芳香族やC1化合物を分解する細菌群や、それらの捕食性細菌群（*Bdellovibrio*属等）が汚泥中で優占化しており、貧栄養での環境を生き抜く微生物生存戦略が垣間見られた。このような貧栄養下での微生物捕食は、パイロットスケールの膜分離活性汚泥リアクター（MBR）を用いた実験においても見出された。人工下水を用いた約50日間の連続運転の結果、活性汚泥濃度（MLSS）が過度に上昇したため、流入廃水の有機物濃度を半減させリアクター系内を貧栄養条件としたところ、MLSSが約70%減少した。MLSS減少期間には、捕食性*Lysobacter*属細菌近縁種が増加しており、微生物捕食による活性汚泥減容化の可能性が示された。一方、MBRの分離膜上に堆積するバイオフィーム内部においても、微生物捕食の現象が見出されている。有機物濃度の異なる2種類の人工下水を用いてMBRを連続運転し、それぞれの膜閉塞の過程を調べるため、共焦点反射顕微鏡法により分離膜上に堆積したバイオフィームを構成する細胞由来高分子を可視化した。一方の運転では多糖が、他方では脂質が主要な構成成分として検出されるなど、有機物濃度が違うと、異なる機構で膜が閉塞することが考えられた。次世代シークエンサーを用いてバイオフィーム中の微生物を解析した結果、脂質が主要な構成成分となった要因として、バイオフィーム中での異種細菌の捕食被食関係が原因となって生じる死細胞膜脂質が膜上に蓄積していた可能性が示された。このように汚泥中では様々な状況で多様な捕食現象が起こっているが、この個別の知見を水処理プロセス全体の高効率化や安定的維持管理にフィードバックすることが本当に可能であるか？それを実現するための取り組みや、今後の展望についても紹介する。

原核生物のリボソームは、3つのRNAと50余りのタンパク質から構成される複雑な超分子複合体である。なかでも16S及び23S rRNAはリボソームの中心を占め、多くのタンパク質と緊密な相互作用をしている。このため、変異に対して脆弱で、水平伝播に代表される劇的な遺伝的变化は受け入れないと考えられてきた。16S rRNA遺伝子の配列が進化系統解析の分子マーカーとなっているのも、この「種固有性」に基づいている。これに対し我々は、大腸菌16S rRNAの遺伝子欠損株の生育を、網 (Kitahara et al., 2012) や門 (佃・宮崎、未発表) レベルで異なる異種16S rRNAにより相補可能なことを発見した。さらにアシドバクテリア門由来の16S rRNAを含む変異株は、生育不良 (倍加時間の増大) に陥るものの、大腸菌16S rRNAと異なる334塩基のうち、わずか2塩基を大腸菌型に戻すことで生育がほぼ復帰した。これは、アシドバクテリア門と大腸菌16S rRNAを分かつ変異の大半が機能的に中立であることを示唆している。また、異なる16S rRNAが共通のリボソーム内で機能するという事は、16S rRNAとタンパク質間の相互作用パターンが、系統を超えて保存されていることを示唆している。このことは、Lakeらが唱えるComplexity Hypothesis —複雑な系の中に置かれた成分の遺伝子は水平伝播しない— とは相反する。さらに我々は遺伝子全長ではなくドメイン単位で異種のもの置き換えたキメラや、4つのドメイン全てが別々の種に由来するキメラも合成し、その中に活性のある配列を見出した (星野・宮崎、未発表)。また、高度好熱菌*Thermus thermophilus*を用いた実験では、*Deinococcus-Thermus*門のいずれの16S rRNAでも生育相補が可能で、常温菌*Deinococcus*属の16S rRNAなどでは生育上限温度が低下することが観察された (泊口・宮崎、未発表)。また、*T. thermophilus*は細胞内に複数の染色体を有することが知られているが、形質転換直後にはヘテロ染色体が存在すること、継代とともにゲノム間組換えにより均一化していくこと、組換え位置により様々なキメラ16S rRNA遺伝子が発生することも観察した。これら実験はすべて我々が「仕組み」系で水平伝播を起こさせたわけだが、*Thermus*で見られる自然形質転換系での機能的なキメラ16S rRNAの出現などは、16S rRNAが組換えに対して非常に寛容であり、自然界でも実際に組換えを駆動力とした進化が起きていることを思わせる。

相馬 亜希子¹, 関根 靖彦², 金井 昭夫³ (¹千葉大院・園芸, ²立教大・理, ³慶應大・先端生命研)

tRNA は、塩基配列として書き込まれた遺伝情報をアミノ酸に翻訳するアダプター分子であり、タンパク質合成過程において中心的な役割を果たす因子の一つである。リボソームをはじめとする多くの翻訳因子と相互作用するため、ほとんどすべての tRNA がクローバーリーフ様の 2 次構造および L 字型の 3 次構造を形成する。その高次構造の維持に関わる塩基配列はアミノ酸種や生物種の違いを超えて高度に保存されており、したがって tRNA およびその遺伝子の成立についての研究は、タンパク質合成系の進化を考える上でも重要な知見を与えると期待される。tRNA は古くから研究されてきた分子であり、モデル微生物やオルガネラを用いた解析によるアンチコドンのコドン認識機構に関する知見は、tRNA レポートリーの予測に大きな役割を果たしている。一方、近年のゲノムリソースの数・質の向上に伴い、tRNA 遺伝子やその発現機構に関する情報も飛躍的に増加した。特に極限環境生物をはじめとするモデル生物以外の様々な生物のゲノム配列決定や分子生物学的解析が進み、進化系統的に比較的始原的と予想される生物種からユニークな特徴をもつ tRNA 遺伝子群が見出されている。特に、古細菌の系統樹の根元に近い位置から分岐しているナノ古細菌や超高熱好酸性古細菌から発見された trans-splicing tRNA 遺伝子 (Split tRNA) や、古細菌に加えて単細胞始原紅藻から発見された逆転構造をもつ Permuted tRNA 遺伝子および非典型的イントロンを含む cis-splicing tRNA 遺伝子の発見は、tRNA 遺伝子構造の多様性を明らかにし、様々な概念に基づく tRNA の成熟化 (プロセッシング) 戦略の存在を示した。これにより、既存のデータベースからも未同定だった tRNA 遺伝子が同定されたほか、tRNA の構造や遺伝子の起源および進化における新たな知見がもたらされた。本発表では、tRNA 遺伝子の構造およびその発現システムの多様性と、クローバーリーフ様構造の成立過程に関する考察を紹介する。

最近、新規アーキア門の1群が報告され、それらのゲノムには膜輸送などに関わる「真核生物特異的」タンパク質のホモログがコードされていた。そのため、真核細胞の起源はアーキアが宿主であるという仮説が支持される機運が高まっている。また、以前から、アーキアの遺伝情報維持・発現に関連する重要なタンパク質は、構造機能的に真核生物のものと酷似しており、真核生物と比較して非常にシンプルな分子構造であることが知られている。したがって、アーキアは、我々ヒトを含む真核細胞の起源や生命進化を解明する研究だけでなく、真核生物の代替研究を行う上で貴重なモデル微生物である。本発表では、いかにアーキアが生存戦略のために、タンパク質に新たな機能を付与し、RNAを多様化させたのか？いわゆる「タンパク質とRNAの共進化」仮説を前駆体tRNA中のイントロンを切断するRNAスプライシングエンドヌクレアーゼの基質認識機構とtRNAイントロンの多様化を例に検証する。一方、アーキアが高温環境下で生育するのに、tRNA中の特定部位の修飾ヌクレオシドが必須であることを見出した。酵母にも、その修飾ヌクレオシドは保存されているが、生育に何も影響しない。よって、原始地球の高温環境下では、tRNAの耐熱化が必須であり、低温環境に移行した現在では、その修飾ヌクレオシドが進化の名残として真核生物に受け継がれたのではないだろうか？このことについて更に議論を深めたいと考えている。

古典的なセントラルドグマではmRNAは単にDNAからタンパク質に遺伝情報を伝達する鋳型と考えられてきた。転写レベルの遺伝子発現制御はDNAとタンパク質との相互作用に支配されている一方、転写後レベルの遺伝子発現制御はRNAとRNAとの塩基対形成もしくはRNAとタンパク質との結合によって引き起こされる。この約30年間に転写後レベルの制御因子としてタンパク質をコードしない小さなRNA (sRNA) が数多く発見され、その作用機構が解析されてきた。sRNAと標的mRNAとの塩基対形成を促進するRNAシャペロンHfqはほぼ全ての原核生物で保存されており、広大な転写後制御ネットワークを形成している。一般的にHfq依存性sRNAはmRNAの5'UTRもしくはCDSに結合して翻訳・RNA安定性を制御する。HfqはsRNAが持つステムループ構造に続く3'末端の6塩基以上のUに結合する性質がある。このようなRNAモジュールは一般的にRho因子非依存的な転写終結によって生成することから、Hfqは一部のmRNAの3'末端にも結合する。そして、mRNAの3'UTRがHfq依存性sRNAと同様に制御因子として機能することが可能となる。本講演では、グルタミン酸・アスパラギン酸ABCトランスポーターをコードする *gltI* やスクシニルCoA合成酵素をコードする *sucD* など、mRNAの3'末端が実際に生体内で遺伝子発現を制御する例を紹介する。

大野 宗祐 (Planetary Exploration Research Center, Chiba Institute of Technology)

地球生命圏の上端biopauseは、生命の普遍性や起源、進化、分布、あるいは地球/地球外間の生命の流入/脱出の有無を理解する上で非常に重要である。これまでの研究から、地球大気成層圏（高度約10kmから50km）での微生物の存在が知られており、これがbiopauseに相当すると考えられる。ところが、先行研究では地上微生物の混入防止策が不十分なものも多いほか、散発的な試料採取と培養法での分析しか行われておらず、成層圏微生物の動態や全体像の把握には至っていない。そこで我々は、成層圏微生物の全体像を把握することを目指し大気球による成層圏微生物採取実験「Biopauseプロジェクト」を行っている。地上微生物の混入可能性を劇的に減らす降下式インパクター型試料採集装置を新規に開発し、気球で上昇後パラシュートで降下させる際に試料採取を行う。採取した試料は多角的な分析を行うことで難培養性微生物も含めた成層圏微生物全てを観測することができる。2016年度に行った第一回目の大気球実験では、新規開発した降下式インパクター型試料採取装置を用いた、成層圏微粒子の採取に成功した。また、培養できないものも含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて観測することに成功した。本講演では、2017年6月に北海道のJAXA大樹航空宇宙実験場にて行う予定の本プロジェクトの第2回目の気球実験の概要と初期分析の結果についても併せて紹介する。※本研究の大気球実験は、JAXA宇宙科学研究所が提供する大気球による飛翔機会を利用し、JAXAの協力のもとで行われました。また、本研究には自然科学研究機構、日本学術振興会科研費の助成を頂きました。

那須 正夫¹, 一條 知昭², 杉田 隆³ (¹大阪大谷大・薬, ²大阪大・院薬, ³明治薬科大)

宇宙居住環境は微小重力かつ宇宙線に曝露される閉鎖環境であり、生態系は主にヒトと微生物から構成される。生態系の恒常性の維持は機械的なシステムが担い、多くの場合、微生物の果たす役割はこれらのシステムによって置き換えられ、微生物は厳しく管理されている。しかしながら、ヒトと微生物の関係が地上と比べて大きく変化すると考えられており、「宇宙に生きる」ためには、宇宙居住空間におけるヒトと微生物の関係を理解し、共生するための基盤的な知見を集積する必要がある。そこで私たちは2009年から宇宙居住の衛生微生物学的安全確保を目的にJAXAと共同で国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物モニタリングを継続的に実施している。またその成果の地上応用、さらには宇宙居住のモデル環境として、宇宙居住環境と同様、厳密な基準のもとに微生物管理された環境である医薬品製造施設を対象とした微生物群集の網羅解析を行っている。施設内の管理区域における浮遊細菌、壁面付着細菌の現存量は16S rRNA遺伝子を標的とした定量的PCR法により測定し、細菌及び真菌の群集構造は16S rRNA遺伝子、26S rRNA遺伝子を標的としたアンプリコンシークエンシング法により解析した。その結果、細菌群集構造においては国際宇宙ステーション (ISS) と同様に、ヒト由来の指標となりうる細菌が優占した。真菌群集構造においては、ヒト皮膚由来真菌である *Malassezia* が優占しその菌種構成比率も皮膚のそれと同様であった。同様にISS内環境および宇宙飛行士の皮膚構造も *Malassezia* が優占していた。*本研究の一部は文部科学省科研費JP15H05946の助成により実施した。

榎村 浩一

(帝京大・医共教研, 帝京大・医真菌研, 帝京大・アジア感染研, 帝京大・院・医・宇宙環境医学, 帝京大・院・医療技・臨床検査医学)

日本実験棟「きぼう」が国際宇宙ステーション (ISS) に設置 (2008年) され、独自の宇宙輸送船「HTV(こうのとり)」の運用が成功して以来、我が国にも宇宙の利用主体としての有人宇宙環境が開かれた。これはすなわち、宇宙環境にあっても我が国の施設とその乗員の健全性は、有人宇宙計画の当事者として我が国の科学と技術によって担保する責任を負ったことを意味するものである。ISSにヒトがいる限り、宇宙にあっても常在菌として、あるいは環境菌としての真菌との関係を断ち切ることは出来ない。これら真菌叢が、宇宙におけるヒト生活環境において機器の健全性に影響を及ぼす事例が報告されており、宇宙飛行士に対する影響も考慮しなくてはならない。軌道上乗員の常在真菌叢を調査した研究は、文献上1970年代のアポロ計画以降に行われていなかった。常在真菌叢の構成は、宿主であるヒトの免疫と様々なストレスによって、大きく変動することが明らかにされている。そこで、ISS乗員の常在菌叢の構成と変遷により、乗員に与えられるストレスを加味した宿主・寄生体関係の解析を可能にし、以て日和見感染対策に資することも可能となろう。そのため、「きぼう」を中心としたISS内設備及び乗員における微生物叢を明らかにし、その管理を可能にする手段が求められていた。宇宙環境における微生物研究プロジェクト研究は、演者らの研究グループによって1998年の地上研究から継続的に行われており、2009年以降は宇宙航空研究開発機構との共同研究としてISSにおける環境微生物叢に関する研究 (Microbe-I~IV) および常在微生物叢と宇宙飛行士の健康障害に関する研究を推進している。また、有人宇宙環境をはじめとした人工的有人環境において問題となっている環境および常在微生物による健康障害の管理等、宇宙環境医学上の学際的研究・開発を推進する上では、その対照として院内環境等の地上における人工的有人環境をフィールドとした研究も行われている。現状において宇宙ステーション「きぼう」環境は清浄に保たれているが、その一方で「きぼう」に持ち込まれた真菌は、限られ「偏った」真菌叢であることも明らかになっており、人工的有人閉鎖環境において、これら菌叢の管理に係る研究と開発が求められている。ここで開発した技術は宇宙に限らず、地上における臨床的技術にも応用が期待される。以上を踏まえて、宇宙微生物研究Microbe-I~IVを中心に紹介したい。

河口 優子 (東京薬科大学・生命科学)

宇宙空間を微生物が移動しているのではないか、というパンスペルミア仮説が約100年前に提唱された。そこで、国際宇宙ステーションの船外部を用いてパンスペルミア説を検証するたんぼぼ計画が進行中である。採集実験では、地球からの微生物を含む粒子の脱出の可能性を検証する。微生物の曝露実験では、地球微生物の宇宙環境での極限環境耐性を調べる。放射線抵抗性細菌Deinococcus属の乾燥菌体を宇宙に1年間曝露し、解析したところ100 μ mの細胞の凝集体は紫外線の影響で死滅するが、500 μ m以上の凝集体は生存した。これまで、ヨーロッパのチームが行った微生物の宇宙曝露実験の結果より、岩石の内部に微生物が存在すれば宇宙でも長期生存可能であることを明らかにした。本実験の結果は、岩石の様な大きな物質を介さなくても、微生物が宇宙空間で生存可能であることを示している。微生物の凝集体が地球から出て行っているのかどうかを調べるために、現在宇宙で捕獲した微粒子の解析を進めている。曝露実験、採集実験の結果を合わせて、パンスペルミア仮説を議論する。

約45億年前の火星は、海や、大気を保護する磁場もあるなど、生命が誕生したころの地球とよく似た環境であったと考えられており、火星でも生命が誕生した可能性が議論されている。また、最近の知見により、現在も表面付近に生命（微生物）が生き残っている可能性が出てきた。現在の火星は、乾燥した低温低圧環境であり、生命が存在するには厳しい環境に見えるが、いずれの環境因子も、地球上の微生物で報告されている生存限界範囲内にある。また、現在火星上で活動しているキュリオシティローバーによって有機物が検出され、メタンや硫化鉄など化学合成独立栄養細菌のエネルギー源となる物質や、RSL (Recurring Slope Lineae) と呼ばれる液体の水が流れている可能性が高い場所も見つかるなど、生命の存在に必要な材料（有機物、エネルギー源、水）も揃っている。1976年のバイキング着陸機による生命探査では、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法で有機物が検出されなかったことなどから、生命の存在は確認できなかったが、その後、新たな生命探査技術の開発も進んでおり、2020年打ち上げのMars2020計画 (NASA) やExoMars2020計画 (ESA & Roscosmos) では、ラマン分光法などを利用した有機物検出装置が用いられる予定になっている。日本のグループもまた、蛍光顕微鏡法を利用した探査技術の開発 (LDM: Life Detection Microscope) を行っている。この方法の特徴としては、(1) 蛍光色素の種類を変えることによって、タンパク質や核酸などの生体成分を検出できること、(2) 生命（微生物）の生死を区別して検出できること、(3) ラマン分光法に比べて感度が高いこと、(4) 1 mの空間分解能を有し形態情報が得られることなどがあげられ、有機物の他、微生物細胞も検出できることが従来の装置にない利点である。現在、染色液添加機構や光学システムの設計、低温低圧下での染色法、微生物と鉱物との識別法などの課題に取り組んでいる。特に、蛍光顕微鏡法では、鉱物の自家蛍光や、蛍光色素の鉱物への非特異的吸着により、鉱物を微生物と誤認識する可能性があり、識別の問題は重要な課題である。本講演では、火星模擬土を使った染色試験、鉱物との識別法、装置設計など、LDMの開発状況を紹介する。

抗生物質を含む多様な二次代謝産物生産を行う *Streptomyces* 属放線菌は、近年のゲノム解析の進展により 1 菌株あたり 30～40 個の二次代謝生成遺伝子クラスターを有することが明らかとなったが、実験室での実際の培養では、そのうちの数種類しか生産しない。このことは放線菌二次代謝の潜在能力は従来の私たちの予想以上に高く、これまでに発見された抗生物質は極一部であり、未同定の抗生物質が多数存在することを強く示唆している。土壌細菌である放線菌は生育環境中では多様な微生物に囲まれて生存している。放線菌がなぜ多様な二次代謝を行うのかについては議論の余地があるが、一つの仮説として、土壌中での他微生物との生存競争を有利にするために行っているという説がある。そこで、この仮説を実証するために、放線菌の二次代謝を活性化する微生物の探索を行った。その結果 *Streptomyces lividans* (Sl 菌) の潜在的二次代謝産物 (赤色色素性抗生物質) である undecylprodigiocin 及び actinorhodin の生産を誘導する微生物 *Tsukamurella pulmonis* (Tp 菌) を発見した。その後の研究から、ミコール酸を細胞表層に有する Tp 近縁種はもちろんのこと、近縁属である *Rhodococcus* や *Corynebacterium*、*Mycobacterium* 等においても同様な赤色色素生産誘導活性が見出された。さらに、112 株の自然分離放線菌と Tp 菌とを共培養したところ、その 9 割近くにおいて二次代謝の変化が観察された。以上のように、放線菌とミコール酸含有細菌を共培養することにより潜在的二次代謝を活性化する培養法を確立し、「複合培養」と命名した。本複合培養法を用いて新規二次代謝産物の探索を行い、これまでに Alchivemycin をはじめとする 5 種 17 個の新規化合物の同定に成功した。さらに、複合培養法の作用機構解析を行った結果、両菌が物理的に接触することが活性化には重要であり、物質等のやりとりで活性化しているのではないことが明らかとなった。このことは目も耳も持たない微生物が接触を感知し他者を認識していることを示しており、生物の他者感知機構の進化に関して考察する上でも興味深い。H. Onaka*, Y. Mori, Y. Igarashi, T. Furumai, Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol.* 77(2): 400-6 (2011)

天然から単離される生物活性分子（いわゆる天然物）の中には、産生物にとってだけでなく、人類にとっても有用なものがあり、薬剤として広く活用されてきた。既存の天然物の利用法としては、単離した天然物をそのまま用いたり、構造を改変することでより強い活性や良好な薬物動態を示すものに『改良』するものが多く知られている。一方で本研究では、天然物の特徴的な骨格モチーフを含有する人工の化合物ライブラリーをde novoに構築することで、任意の生物活性を有する擬天然物をゼロから『創製』するシステムの構築を目標としている。具体的には、ペプチド性天然物の主鎖骨格に多く見受けられる、チアゾリンやオキサゾリンに代表されるヘテロ五員環骨格に注目した。これら主鎖ヘテロ環骨格は、ペプチダーゼによる分解に対する耐性や標的分子への結合において大きな役割を果たしており、強い生理活性を示すペプチド性天然物の重要な骨格モチーフと言える。我々はこれまでに、改変無細胞翻訳系[1]と特定の翻訳後修飾酵素とを試験管内で再構成することで、アゾリン骨格含有ペプチドを簡便に生産可能な人工生成系（FIT-PatDシステム）の構築に成功している[2]。本講演では、FIT-PatDシステムを用いたアゾリン骨格含有ペプチドの合成や擬天然物候補の探索などについて紹介する。[1] Goto, Y., et al., (2011) Nat. Protoc., 6, 779. [2] Goto, Y., et al., (2014) Chem. Biol., 21, 766.

佐藤 俊輔, 青木 里奈, 有川 尚志, 小林 新吾, 田岡 直明

(株)カネカ・Health Care Solutions Research Institute, バイオテクノロジー開発研究所

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (以下、PHBH)は高い生分解性を有する天然型高分子であり、植物油脂や糖質などの再生可能原料から、微生物発酵によって生産される。PHBH産生微生物は、土壌や海洋などから数多く発見されており、その分解微生物もまた、様々な環境から単離されている。そのため、その高い生分解性を活かした、農業資材、海洋資材、コンポスト袋、紙コーティング用樹脂などへの用途展開が期待されている。例えば、近年、「マイクロプラスチック」による海洋汚染がグローバル問題として取り上げられている。様々な原因により、海洋へ流出してしまったプラスチックは、紫外線や波力によって次第に微細化され、5mm以下のマイクロプラスチックとなる。このマイクロプラスチックは、海洋中の様々な疎水物質を吸着、濃縮することが明らかになってきており、それら物質の生物濃縮による大型動物への移行が危惧されている。PHBHは海洋分解性に優れることが明らかとなっており、マイクロプラスチックを形成しにくい素材である。我々は、PHBHをプラスチック材料などへ展開することで、マイクロプラスチック問題や石油資源の浪費削減を実現するバイオエコノミーに対する「ソリューション提供」を目指している。3-hydroxybutyrate (3HB)と3-hydroxyhexanoate(3HHx)から成るPHBHの物性は、その3HHx組成比によって変化し、例えば3HHx比率が7mol%程度のPHBHは結晶化度が高く、ポリプロピレン様の物性を示す。一方で3HHx組成11mol%程度のPHBHは、結晶化度が低下し、軟質なポリエチレン様の物性を示す。このように樹脂物性が制御可能であることで、PHBHは石油由来のプラスチックの代替素材としての可能性を有している。上述したように、PHBHの工業生産においては、その3HHx組成を制御することが、品質の安定化に極めて重要である。我々は、生産微生物である*Cupriavidus necator*におけるPHBH生産経路の中で3HHxモノマーの供給に関する鍵酵素であるエノイル-CoAヒドラーゼ遺伝子 (phaJ) の発現を精密制御することで、所望の3HHx組成を有するPHBHの生産技術を開発した。本発表では、PHBH発酵生産菌の育種から、樹脂用途を中心とした実用化に関して発表する。

米島 靖記 (日東薬品工業株式会社 研究開発本部 研究開発部 菌・代謝物研究センター)

乳酸菌や発酵食品が体に有益な効果をもたらすことは昔から知られていたが、その効果を発揮する詳細なメカニズムの大半は不明なままであった。しかし、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析や代謝物のメタボロミクス解析といった分析技術の導入により、腸内細菌研究が飛躍的に進歩した結果、宿主の生理機能が腸内細菌の代謝物「ポストバイオティクス」を介して調整されることが明らかとなってきた。さらに腸内細菌叢の構成菌種として一般的な乳酸菌が保有する酵素群によってリノール酸、 α -リノレン酸などの不飽和脂肪酸の二重結合をターゲットに水和、酸化、還元、脱水反応を触媒し、種々の水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、共役リノール酸を産生することが解明されている¹⁾。これら化合物のうち、10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid「HYA」は植物油脂の主要成分であるリノール酸が腸内細菌による代謝を受けて生成される水酸化脂肪酸であり、代謝改善作用²⁾、脂肪合成抑制機能³⁾、血糖値低減機能⁴⁾、腸管バリア保護機能⁵⁾、抗炎症作用⁶⁾など、様々な生理活性が認められている。腸内細菌は宿主と共生関係にあると言われ、その腸内細菌が食事由来の脂質を代謝して、我々の体に有益な代謝物を産生していることが想定されるが、腸内細菌叢の構成は人種による違いはもちろん個体差があり、たとえ同じ食事を摂取しても、腸内細菌による効果の現れ方は異なることが考えられる。そこで、我々は、腸内細菌の代謝物を活用すれば、個人個人の腸内細菌叢の構成に関わらず誰でも健康を維持できると考え、HYAの食品向け実用化を検討した。食用油を基質に乳酸菌によるHYAの大量生産を試み、パイロットスケールでの生産方法を開発した。本シンポジウムの中で、実用化に向けた取り組みについて紹介する。1)Kishino S, et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA., 110, 17808-17813.2)Goto T, et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 459, 597-603.3)Nanthirudjanar T, et al. (2015) Lipids., 50, 1093-1102.4)Miyamoto J. The 2016 annual conference of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. Sapporo. JAPAN. 2016-03.5)Miyamoto J, et al. (2015) J Biol Chem., 290, 29022-2918.6)Bergamo P, et al. (2014) J Funct Foods., 11, 192-202.

小池田 聡¹, 吉田 和典^{1,2}, 依馬 正² (¹天野エンザイム株式会社, ²岡山大院自然科学)

1. はじめに 酵素は、食品、医薬品、日用品など多岐に渡る分野の「ものづくり」に利用されており、我々の生活に密接に関係している天然触媒である。これら産業利用される酵素を取得する手法として、「自然界からの探索」が一般的に知られている。近年、タンパク工学の技術進歩が目覚ましく、必要な酵素を取得する選択肢として「自然界からの探索」に加え、「既知酵素からの改良」も選択できる時代を迎えている。本講演では、タンパク質工学的手法のトレンドを紹介するとともに、産業利用されている酵素を機能改良した一例として、*Burkholderia cepacia* Lipase (BCL) の改良事例を紹介する。

2. 酵素の機能改良におけるタンパク質工学的手法のトレンド 近年、タンパク質工学的手法による酵素の機能改良は、遺伝子情報やタンパク構造情報の充実、バイオインフォマティクスや遺伝子改変技術の進歩と相まって、開発期間の大幅な短縮が可能になっている。これらの技術進歩により、酵素の合理的設計の精度向上のみならず、近年では30~40個のアミノ酸置換点を組合せた最適酵素のデザインが可能になっている。

3. *Burkholderia cepacia* Lipase (BCL) の機能改良 *Burkholderia cepacia* Lipase (BCL) は、幅広い基質に対して高い立体選択性を示すため、有機成分分野で幅広く使用される生体触媒の1つである。しかし、酵素の安定性（熱、pH、有機溶媒）や基質特異性の問題から適用範囲が限定される場合もある。安定性の改良について、タンパク構造情報を基にした酵素設計を試みた。その結果、著しい耐熱性・耐酸性・有機溶媒耐性を示す変異型酵素の取得に成功している。これらの変異型酵素は、幅広く産業利用されることが期待される。

メタゲノム解析や培養を介さずに微生物を研究する技術が急速に進展する現在においても、微生物の分離・培養株を用いた研究の重要性は変わらない。環境中の微生物は極めて多様で、我々は未だそのわずかのみを分離しているに過ぎないが、研究の再現性を得るためにも、比較研究や発展研究のためにも、分離株はどこかに保存されていて利用可能になっていることが必要で、カルチャーコレクションはその役割を果たしている。我々Japan Collection of Microorganisms (JCM)は、環境や健康の研究に貢献するために多様な微生物株を整備している。分離株をやみくもに数多く収集するのではなく、微生物種の基準株など性状が明らかで研究に重要な微生物株といった質的観点を重視した整備に努め、幅広い分野の多くの研究者に利用いただいている。利用にあたって、誤った微生物を提供することがないように、収集・保存時または提供時に遺伝子配列を検査するなど、徹底した品質管理にも努めている。昨今は、論文発表の際に、研究で用いた微生物株を公的機関に預けて利用可能とすることが求められており、微生物株の寄託に迅速かつ確実に対応することも重要な使命となっている。様々な環境由来の微生物株は、メタゲノムの参照配列を得るためにも、メタゲノムで検出された微生物種の生きた研究材料としてもきわめて有用である。また、様々な有用機能や新機能をもつ微生物のスクリーニングにも活用されている。このようにJCM等のコレクションを利活用することで、研究の展開や深化をはかることが期待されるが、そのためには各微生物株のゲノム情報などの付随情報の充実や、希望する微生物株を容易に検索できるようなデータベース機能の向上などが求められる。さらに、今後の研究動向やニーズに合致するような整備戦略も重要である。カルチャーコレクションを整備する側と、それを利活用する側の相互理解・協力関係が益々重要になると考えられる。

仁木 宏典 (国立遺伝学研究所 系統生物研究センター)

バイオリソース無くしてバイオリサーチ無し。この考えの基に生物材料の価値を見直し、それまで研究室や研究機関で保存されて来ていた生物実験材料を組織的に継続して保存、活用しようとナショナルバイオリソース事業(NBRP)始まった。5年を一期として3期15年が経過した。NBRP大腸菌・枯草菌は当初からこの事業に参加し、分子遺伝学の研究材料として作成されてきた大腸菌K12株系統、枯草菌168系統の変異体を国内外から収集し、分譲を行なっている。今年度から新たに第4期のNBRP始まり、新たな事業の展開を始めている。これまでどおり、分譲依頼に対して迅速な配布を行うことは当然として、これまでに収集した菌株を時代に合わせて活用できるよう取り組み始めている。その一つが、全ゲノム配列による変異の確認作業である。これまでは、表現形やPCRによる遺伝子変異の有無の確認により当該変異を確認していたが、全ゲノム配列解析の普及により、変異株全体の変異を確認できるようになった。これにより見逃されていた変異も明らかになる。他方、分子遺伝学研究の基礎研究でかつて作成された変異株が現代の組換えDNA技術として活用でき、再び脚光を浴びるケースもでてきた。NBRP大腸菌・枯草菌のコレクションの概要を紹介しながら、これらの変異体リソースの研究での活用を紹介する。

ゲノムやメタゲノムから、微生物や微生物生態系が持つ機能ポテンシャルを明らかにするための情報としてパスウェイや機能モジュールデータベースは有効である。例えば、KEGG、BioCyc、SEED Subsystemなどのパスウェイデータベースが、MG-RASTやMEGANに代表される機能アノテーションシステムに応用されている。KEGGでは、パスウェイ以外にもゲノム、オーソログ、機能分類データベースも整備しており、それらを利用したアノテーションシステムKOALA、KAASも開発している。一方で、遺伝子レベルでの機能アノテーション結果を単にパスウェイにマッピングするだけでは、実際に調べたい機能があるかどうかを自動的に判断することは難しい。そこで、我々はKEGGモジュールに含まれる機能遺伝子の充足率を基に、機能の有無を判定できるシステムMAPLE (Metabolic and physiological potential evaluator) を開発してきた。MAPLEでは、メタゲノムアノテーションにおいて門レベルでの機能の有無を比較できると同時に、個別ゲノムのアノテーション結果を比較する機能も持つ。最近のゲノム解析技術の一層の発展により、ウイルスや原核生物ではメタゲノムから完全ゲノムまたはそれに近いドラフトゲノムが得られるようになってきた。環境メタゲノムから、個別菌種のゲノムが明らかになり、そこから機能アノテーションが可能になると、モジュールレベルで機能の有無を評価することができるようになるとともに、環境中での生物種間相互作用も見えてくると期待される。また、本来あるべき機能遺伝子が抜けている例も探すことができるようになると期待される。そのような場合、ゲノム中の機能未知遺伝子の中から抜けに対応する遺伝子を探すことができれば、新たな機能遺伝子の発見につなげることができる。複数のオミックス情報を組み合わせて遺伝子機能を予測するツールは既に幾つか開発されており、例えば、これらとMAPLEを組み合わせることは機能未知遺伝子の予測に有効であると考えられる。本発表では、MAPLEの最近の機能拡張について紹介するとともに、その解析結果を用いてゲノム・メタゲノムと機能との関係を更に調べるためのアプローチについて議論したい。

微生物は発酵や抗生物質生産、感染症など様々な人間活動に深く関わっているため研究の歴史も古く、蓄積されたデータや知識は膨大かつ多様である。さらにゲノムやメタゲノムなどの大規模データも多数産出されているため、これらを横断的かつ簡便に利用出来れば、新たな仮説の創出がより容易になると期待できる。我々は、国内外に散在する細菌の各種オミックス情報を広く収集し、遺伝子、ゲノム、環境の3つの軸に沿って様々な知識を整理し、ゲノム情報を核としてセマンティックウェブ技術により統合した統合データベース「MicrobeDB.jp」をこれまで開発してきた。MicrobeDB.jpでは、細菌のみならず真菌類、藻類を対象として拡張し、統合DBを用いた解析結果を提示するアプリケーション群の開発や利用性の向上を徹底する事で、単なる統計量の羅列ではなく、大規模データから新規知識を容易に引き出す事が可能なシステムを構築する事を目標として研究開発を行っている。MicrobeDB.jpのWebサイト: <http://microbedb.jp/MDB/>

岩崎 渉 (東京大・院理, 東京大・大海研, 東京大・院新領域)

データベース・カルチャーコレクションは、微生物の進化をひもといていく上で極めて重要なリソースである。とりわけ、生物が持つ遺伝情報の全体であるゲノムは生命活動を支える最も重要な基盤であるが、多様な環境に生きる微生物のゲノムがどのように形作られてきたのか、そのメカニズムに迫ることが可能になりつつある。本講演では、これらのゲノム情報を活用することによって進めてきた微生物ゲノム進化研究について紹介するとともに、データベース・カルチャーコレクションを今後どのように発展させ、活用させていくかについて議論したい。

高島 勇介^{1,2}, 成澤 才彦² (1東京農工大院・連合農学, 2茨城大・農)

生物間における共生関係は多くの生物種で見出され、互いの生存・繁殖に不可欠である。例えば、ゴキブリの菌細胞の発見 (Blochmann, 1887) やマメ科植物からの根粒菌の分離 (Beijerinck, 1888) など動植物の共生細菌は、既に1880年代に報告されている。一方、菌類の共生細菌に関しては、1970年代にグロムス亜門菌類の厚壁孢子内に細菌様構造物を発見したことが最初である (Mosse, 1970)。現在までに3門4亜門7綱21目36科41属約73種148系統の菌類より菌類内生細菌が報告されている (高島ら, 2015)。さらに2005年には、イネ苗立枯病菌 *Rhizopus microsporus* による植物毒素リゾキシンの生産能力を共生細菌 *Burkholderia rhizoxinica* がコントロールしていることが示された (Partida-Martinez and Hertweck, 2005)。これにより、菌類–細菌を1つの複合系として捉え、その生態を理解する必要性が提示された。演者を含む研究グループでは、ケカビ門菌類に属する土壌菌類 *Mortierella elongata* の菌糸内より *Burkholderiaceae* 科に属する内生細菌を検出し (Sato *et al.*, 2010)、ゲノム解析によりシステイン合成能を欠くことを示した (Fujimura *et al.*, 2014)。また、培地成分を検討することで分離培養に成功し、新属新種の内生細菌 *Mycoavidus cysteinexigens* として記載報告している (Ohshima *et al.*, 2016)。さらに、これまでに *Mortierella* 属菌230菌株について内生細菌のスクリーニングを行い、*M. elongata* を含む *Mortierella* 属菌15種53菌株 (23%) および4種10菌株 (4%) より *Burkholderiaceae* 科および *Mollicutes* 綱に属する内生細菌の存在を確認している。これまで検出された内生細菌は、*M. cysteinexigens* を除き、新規な系統群に属しており、その生態および宿主に与える影響は明らかになっていない。そこでホモタリックに接合孢子を形成する *Mortierella* sp. を材料とし、*Burkholderiaceae* 科に属する内生細菌保有株および除去株における接合孢子形成を観察したところ、保有株では接合孢子形成がほとんど確認されなかったが、除去株では、旺盛な孢子形成が認められた。この結果は、菌類内生細菌が宿主の有性生殖構造の形成に影響を与えることを示した初めての報告である。本講演では、特に宿主菌類の形態および代謝変化に関わる菌類内生細菌の影響に関して研究例を紹介し、内生細菌は宿主菌類をどう変えるのかを考察する。

昆虫は現在100万種以上が記録されており、一説には全動物種の8割を占めるとも言われている。一方、細菌は地球上のいたるところに存在しており、培養され命名されているものこそ5000種ほどであるが、難培養性のものや、極限環境にいる未知の細菌を含めた多様性は昆虫をはるかに凌ぐであろうことは想像に難くない。もちろん昆虫の体内にも、多種多様な細菌が存在している。そして、これらの細菌（以後、純粋に「共に生きている」という意味で「共生細菌」と呼ぶ）には、昆虫との長い共生の歴史のなかで、宿主にとって（もしくは自分だけに）有益な生物機能を発揮するようになったものが存在する。しかも、昆虫と細菌双方の多様性を反映して、その共生のスタイルは非常にバラエティに富んだものへと共進化を遂げている。例えば、昆虫の体内に共生専用の細胞（＝「菌細胞」）が存在したり、互いの遺伝子の機能を分担することでゲノムが縮小すると同時に、互いがいなくては生存できない関係になってしまったり、昆虫の餌利用や体色といった宿主の生存に関わる重要な表現型に共生細菌が関わっていたり、昆虫の生殖といった高次生物機能を共生細菌が操作したりといったケースが多数報告されている。このように大変魅力的な昆虫共生細菌の世界であるが、共生のメカニズムについてはまだ謎の部分が多く残されている。その理由の一つが、共生細菌の多くが難培養性で単離培養が難しいことである。しかし、言い換えれば、この未知かつ多様な昆虫共生細菌のゲノムには、未開拓の有用遺伝子資源が眠っていることが期待され、まさしく我々の研究モチベーションの一つとなっている。幸いなことに、近年、様々な実験手法の発展や、次世代シーケンサーを用いた、単離培養を介さない共生細菌ゲノム決定技術および網羅的遺伝子発現解析技術（RNA-seq）の確立により、共生のメカニズムにより深くアプローチすることが可能になってきた。本講演では、昆虫共生細菌が宿主に対して示す驚くべき生物機能とその多様性を紹介するとともに、これまで自らが関わってきた（1）宿主昆虫のオスだけを殺してしまう共生細菌、（2）宿主昆虫のクチクラの着色や硬さに関与している共生細菌、の2つのトピックを中心に、次第に明らかになってきた共生の分子メカニズムについてお話ししたい。

土壌中での微生物と植物は微生物との相互作用は、細胞での分子レベルの生理変化や個体での形態形成・生長、さらには植生に至るまで、さまざまな影響を与えている。その中でも高度な共生機構を持つアーバスキュラー菌根菌（以下、菌根菌）との菌根共生、根粒菌との根粒共生では、宿主植物はそれぞれリン酸や窒素などの栄養素を効率的に得ることができ、生育に大きな恩恵を受けている。このような共生による栄養供給を微生物肥料として利用することで、収量の増加や減肥効果が期待されている。しかし、これら共生栄養供給効果の大規模利用を可能とするためには、安定した生物間相互作用の制御と共生効果のさらなる向上にむけた技術開発が必要となる。特に、農業などへの実際の利用を考える際には、共生効果を不安定にするさまざまな環境要因の変動に対応しうる手法の開発が不可欠となる。

我々は菌根共生、根粒共生の制御機構の解明に向けた研究において、植物ホルモン「ジベレリン」(GA)が共生菌の宿主植物への感染に与える影響について解析を行っている。マメ科植物ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)やその他のさまざまな植物種とその共生菌を用いた解析から、GAは菌根菌や共生菌の感染を負に制御することが分かっている。この負の作用は、GAシグナルによる共生遺伝子発現の抑制によって生じており、植物内の共生シグナルはGAシグナルによる干渉を受けることが分かってきた。このように、GAは共生に負の作用を与えるが、共生時には植物内でGA合成遺伝子群の活性化が確認でき、実際に菌が共生した根でのGA濃度は上昇していた。さらに、共生菌でもGAの合成が行われていることが分かってきており、単純なGAによる共生阻害機構では説明できない側面もわかってきている。これらの研究成果とともに、このようなGAによる干渉作用を利用し、GA濃度の調整による共生効果の向上・制御についての研究成果について紹介する。

春間 俊克¹, 升屋 勇人², 山路 恵子³ (¹筑波大学大学院・生命環境, ²森林総合研究所・東北支所, ³筑波大学・生命環境系)

植物-内生菌相互作用は絶妙なバランスで成立しており、環境や植物の生育段階などにより内生菌が病原性を示す場合もあるが、生存に過酷な環境では、環境ストレスに対して植物-内生菌は共生的な関係にあると考えられる。今回は、植物や内生菌に過酷な環境である鉱山跡地に自生する植物と内生菌の相互作用を論じる。対象とした鉱山跡地にはリョウブやススキなどが群落を形成しており、これらの植物は重金属環境に適応していると考えられた。リョウブの自生する調査地土壌はCu、Pb、Znを高濃度に含有していた。リョウブの根からは*Phialocephala fortinii*、*Rhizodermea veluwensis*、*Rhizoscyphus*属糸状菌の3種が主な内生菌として分離された。これらの内生菌を用いて接種試験を行ったところ、未接種のリョウブ実生の生長は著しく抑制された。一方、内生菌を接種されたリョウブ実生の生長量や必須栄養元素のKの吸収が促進され、根の重金属濃度が低濃度に保たれていた。急速な生長は希釈効果を伴うと考えられ、内生菌はリョウブ実生の生長を促進して植物体内の重金属濃度を低濃度に保つことで、重金属耐性を付与していると考えられた。またススキが自生する調査地は酸性土壌であり、重金属の他にAlが強い植物毒性を示すことが知られている。調査地のススキの根には高濃度のAlが含有されていたが重金属は低濃度であり、ススキはAl耐性や重金属排除機構を有すると考えられた。*Chaetomium*属糸状菌や*Phialocephala*属糸状菌などがススキの根内生菌として分離され、特に*Chaetomium*属糸状菌は高いAl解毒能を示した。最も高いAl解毒能を示した*C. cupreum*を用いて接種試験を行ったところ、接種によりススキ実生の生長量は有意に増加し、Alはより毒性を発現しにくい根組織へと局在を変化させることが確認された。一方、未接種のススキ実生もAl毒性を受けずに生長しており、ススキは元来Al耐性を有していると考えられた。調査地において*C. cupreum*はススキの生長を促進し、Alの局在を変化させることでススキのAl耐性を増強していることが示唆された。またAlはCuと吸収競争すると考えられ、Alの蓄積によって重金属の過剰吸収を抑制していると推察された。内生菌は重金属環境などの過酷な環境下では植物と共生的な関係を構築していると考えられ、鉱山跡地など緑化が困難な場所においても、リョウブやススキなどとその内生菌を用いた緑化が有効である可能性が示唆された。

今日の生物学・農学等において、「エンドファイト (endophyte)」の語は植物内部に生息する微生物全般を指したやや漠然とした含意で用いられている。宿主植物と共生関係にあることを暗示しての使用が多いが、潜在感染状態の植物病原菌や日和見感染菌なども「エンドファイト」と認識されうることや、植物と微生物の相互作用が生育ステージや環境条件によって変化しうることから、厳密な定義は難しいのが現状である。とはいえ、細菌、糸状菌等、様々な微生物が「エンドファイト」として、学術上、および産業上、取り上げられ、その性質や農業等への利用が研究されている。近年利用が拡大している「エンドファイト」に、イネ科草本植物を宿主とする *Epichloë* 属の糸状菌がある。植物の穂を侵して「がまの穂病」という植物病害を生じる菌株もあるが、病原性を退化させて種子伝染で植物集団中に維持され、また、植物体内で色々な化合物を分泌して草食動物や害虫を忌避したり、植物の生育を促進したりすることで宿主と相利共生しているものも多く、「エピクロエ・エンドファイト」あるいは「グラスエンドファイト」とも呼ばれている。イチゴツナギ亜科 (広義のムギ類) の植物に広く分布し、かなりの多様性を有する菌群なので、害虫への忌避作用を有しながら家畜毒性が無い菌株・感染植物を探索して、害虫が発生しにくく、不良環境に強い牧草として利用する研究が各国で進められ、筆者らの研究グループでも、こうした牧草を日本国内向けに育種・生産できないか、研究を行っている。オーストラリア・ニュージーランドの研究グループを中心に、食用麦類の生産に応用する研究も進められている。また、「害虫が発生しにくい≒野鳥が寄りつきにくい」という図式を活用し、空港周辺の緑地帯を感染植物で緑化して航空機への鳥害 (バードストライク) を防ごう、という応用例が出て、こちらも注目を集めている。この場合は菌・感染植物の動物毒性が強いほど良い、ということになり、昆虫だけで無く、鳥類・哺乳類も含めて「食えない」草が選抜・育成されている。ゴルフ場向けの芝等で古くからこれに近い利用の試みはあったものの、種子の保存・流通の過程でエンドファイトが死滅してしまう等、品質の不安定さが課題であった。近年の活用例では、採種後の種子の梱包・貯蔵方法等の工夫で品質の安定化が図られつつある。

微生物生態系を理解することは可能なのだろうか。微生物群集構造はランダムに変化しているように見え、供試サンプルによって挙動は異なる。微生物生態系の理解に必要な視点とは何かについて議論したい。内外の刺激に対して、微生物生態系では構成因子である微生物群集の構造が変化するもののシステムは機能的恒常性を示す。実際、微生物燃料電池の負極槽内やフェノールを基質とした長期間の連続集積培養系において、システムの機能は恒常性を発揮した。一方で、微生物群集構造はある期間振動し続けた後、別の状態へ遷移し再び振動するという動的平衡を示す。即ち、システムには複数の安定状態が存在する。それ故、個々の分離株の特性からシステムを理解する還元論的解析では自ずと限界がある。先述したフェノールを基質とした長期間の連続集積培養系における群集構造変遷は、親和性、増殖速度定数および耐性能が低い方向へシフトし、一般的な優占化原理とは異なっていた。この現象を理解するため、本培養系由来分離株を用いた複数の合成微生物生態系を構築し供試菌株の動態を解析した。その結果、速度論量は絶対的な決定因子ではなく、むしろ種間相互作用に基づく増殖能力が重要因子であった。また、いずれの系においても供試菌株全てが共存したものの、フェノール分解能を維持できる系と維持できずに崩壊する系が存在した。合成微生物生態系と複雑な系を結び付けるには、共通の現象を捉えることが必要だろう。そこで土壌を摂取源、フェノールを唯一の炭素源とした連続回分培養系の微生物群集動態が解析された。その結果、フェノールへの適応に伴う群集構造の大きな変化とその後の動的平衡状態が観察された。一連の変化において、優占種 (OTU存在比 0.1%) と希少種 (同 < 0.1%) の累積変動率を比較すると、希少種の方が高いことが示された。この結果は、微生物生態系の恒常性維持に希少種の寄与が大きいことを示唆している。先の合成微生物生態系で恒常性を維持した系では、存在比が全体の0.1%程度で維持される供試菌株が存在したことから、希少種の具体的な役割の解明が待たれる。微生物生態系の理解には、変化し続けるシステムと個の微生物がどのように関わっているのかを理解することが鍵となる。今後、微生物間代謝連携を切り口に、共存および恒常性維持機構の解析を通じて微生物生態系の理解が進展するものと期待したい。

三木 健 (国立台湾大学海洋研究所, 中央研究院環境変遷研究中心)

生態学は、博物学（～菌の生態・～環境の群集組成記載・～生態系のモデルなど）・自然科学（観測・実験・モデリングにより一般理論の構築をめざすもの）・数理学（数学・統計・情報学など）の3つのアプローチの融合分野である。狭義にはその自然科学部分だけが生態学であろう。博物学は自然科学の素材となりうる生命と生態系の多様性や驚異を知らしめ、数理学は一般理論の構築を助ける技法と哲学を提供する。その二つのアプローチの助けにより、注目する生物群・生態系に抛らない生態学理論が構築されるはずだ。しかし、人は易きに流れやすいもので、生物好きは博物学に流れ、数学・計算機好きは数理学に流れ、何時までたっても自然科学としての生態理論は不完全なままである。私自身は博物学には分析的興味は全くなく、自然科学と数理学のあいだを行ったり来たりし生態理論構築への貢献は足踏み状態である。本発表では第一に、生態学における「理論」とは何かについて定義する。この定義付けにより数理モデル（アプローチ）と理論（成果物）との関係性を明らかにする。第二に、生態学における理論のよりよい理解のため、主要な生態学理論の紹介と、生態学の問題解決に有用な「数学理論」との比較、を行う。第三に、対象を限定しないはずの生態学が、実は実験材料に大きく依存した理論しか構築できておらず完全には程遠いこと（もしくは新たな発展フェーズに突入したこと）を論じる。生態学の理論は、対象を限定しないという理想（建前）の下、実際には目に見えるサイズの動・植物集団の振る舞いを理解を目指してきた。それにも関わらず主要な理論は、植物・動物プランクトンを含む広い意味での「微生物」の実験系を基に発展してきた。しかし近年、陸上生態系では、生物間相互作用において植物の「食べられても死なない」という特性や有性生殖に関わる事象に注目が集まっており、致命的な相互作用や無性生殖しか扱えない従来の「微生物」実験系に基づく生態理論の有効性に疑問が生じている。一方の微生物生態学においても、生態学における微生物実験系では扱われてこなかった、個体レベルの代謝機能の多様性や遺伝子の水平伝播などの「微生物らしさ」に注目が集まっており、従来の生態学理論は適用できないのが現状である。以上により、微生物を対象にした生態学において、新たな理論的枠組みの提唱の必要性があると言えるだろう。

多体系において個体の持つ性質が集団の振る舞いに影響を及ぼすことは想像に難くないが、ここでは特に個体の性質として変形性に注目する。数値シミュレーションで観察された現象を紹介し、個体の変形性を持つ場合には、そうでない場合には見られない特異な集団現象が発生し得ることを示す。「鎖状移動体」は、直列に連結した粒子 L 個で構成され、確率的に選択された方向に、変形しながら移動する自己駆動体のモデルである。長さ L が1の場合はランダムウォーク粒子と等価であり、3以上の場合に変形性を持つことになる。 L が3以上の場合と2以下の場合との比較、あるいは L 個の粒子が一直線に並んだままで移動する「棒状移動体」(剛体)との比較から、変形性の効果が確認される。まず、多数の移動体を平面状で移動させるだけの最も単純な系では「自発的で不可逆な凝集」が、個体の変形性を持つ場合に限り観察される。凝集現象のモデルは多数あるが、いずれの場合もモデル自体に個体同士を接着させる過程が含まれている。それに対し、ここでは「接着力」を一切仮定していないにもかかわらず自発的にかつ不可逆的に凝集が発生するのである。また、移動方向の選択にバイアスを持たせる(特定方向の選択確率を高くする)ことで全体として正味の流れを生じさせた系では「完全渋滞への凍結転移」が観察される。ここで完全渋滞とは、全ての個体が停止し、かつ、それが永続する状態を指す。完全渋滞の報告は多数あるが、いずれも対向流や交差流など複数の流れが存在する系や、障害物が存在する場合のものであり、正味一方向で障害物もない最も単純な流れにおける完全渋滞は本研究が最初の報告である。さらに、互いに逆方向にバイアスをかけた二つの移動体群A、Bが混在する系では「対向流による輸送促進」が観察される。すなわち、片方(A群)の正味の流れは、共存する逆方向流(B群)のバイアスが強いほど大きくなり、また、弱い同方向と共存する場合よりも強い逆方向流と共存する場合の方が大きくなり得るのである。これらの現象は、いずれも個体の変形性を持つ場合に限り観察されるものであり、変形性の有無が集団現象に大きな影響を及ぼすことを例示している。シンポジウムでは、現象のメカニズムや高分子物理との関連などについて議論する予定である。環境微生物系との関連についてコメントが受けられれば幸いである。

齋藤 保久¹, 鈴木 研志², 二又 裕之³ (¹島根大院・数理科学領域, ²静岡大院・自然科学系教育部, ³静岡大・グリーン研)

複数種による単一基質をめぐる搾取的競争を考慮した連続培養系の数学理論では、2種類以上の共存は実現しない ([2])。しかしながら、土壌を接種源としフェノールを唯一の炭素源とする実際の連続培養系では、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 ([1], [3])。たとえば、[3]では、フェノールを唯一の炭素源とし、*Ralstonia* sp. P-10株と *Comamonas testosteroni* R2株の二菌株による混合培養系において、同二菌株の定常的な共存が観察された。こうした現象と数学理論とのギャップは、微生物種の営みの洞察不足を意味するのは勿論であるが、同時に、モデルに組み込まれていない要因の重要性を浮き彫りにする。実際[2]では、P-10株がフェノールを分解し、1) その代謝産物であるカテコールはR2株によって分解されているか、あるいは2) 両株がカテコールの分解を共有しているという、前述の数学理論では見逃されていた要因が観察されている。 [3]で観察された、P-10株とR2株による定常的な共存状態でのフェノール分解を、微生物生態系としての機能の発現例だとすれば、そこで成立している二菌株の相互関係が上記1)、2) のどちらなのかを同定することには意義がある。本講演では、こうした問題を数学で解決する試みを紹介したい。実際、同二菌株による混合培養系でのフェノール濃度とその流入速度、および同系の流出速度や両二菌株の基質分解にかかるパラメータはすべて実測可能である一方、P-10株がどの程度カテコールを産出するかは測定不能なのであるが、こうした未知のデータを含む問題に対してアプローチできるのが数学の利点である。参考文献[1] A. A. Fatma Azwani, K. Suzuki, A. Ohtaki, K. Sagegami, H. Hirai, J. Seno, N. Mizuno, Y. Inuzuka, Y. Saito, Y. Tashiro, A. Hiraishi, and H. Futamata, Interspecies interactions are an integral determinant of microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology*. Oct20; 6: 1148.doi: 10.3389/fmicb.2015.01148 (2015)[2] H. L. Smith and P. Waltman, "The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition", Cambridge University Press (1995)[3] 鈴木 研志, Fatma Azwani, 犬塚友麻, 本荘雅宏, 田代陽介, 二又裕之 「競争条件下における異属微生物の共存機構」、微生物生態学会 2016 横須賀 ポスター発表

S-062

貴金属 (Au, Pd, Pt, Rh) を取り込み金属ナノ粒子を産出する微生物

小西 康裕 (大阪府大・院工)

金属イオン還元細菌 (Shewanella属細菌) は、嫌気性環境下において、中性溶液中の白金族金属イオン (Pt(IV)、Pd(II)、Rh(III)) および金イオン (Au(III)) を還元・析出する機能 (バイオミネラルゼーション) をもっていることが見出された。本講演では、Shewanella属細菌による貴金属バイオミネラルゼーションのメカニズムについて解説するとともに、この微生物機能をベースにした新規な分離・回収技術について紹介する。

希土類元素（レアアース：REE）は「産業のビタミン」とも呼ばれ、様々なエレクトロニクス製品等の性能向上に必要不可欠な金属であることから、現在、私たちの社会活動を支える必須元素となっている。しかし、REEが生態系や生命活動にどのように関与するか、その生物学的意義はこれまで知られていなかった。このような中、私たちはメタノールを利用する *Methylobacterium* 属細菌がREEを要求する新奇なメタノール代謝系を持つことを見だし、その鍵酵素がREE依存型メタノール脱水素酵素（MDH）であること、さらには本代謝系が様々な微生物群に広く分布することを示してきた。本講演では、この新奇なREE依存型メタノール代謝系について解説し、その機能と生物学的意義について考察する。

1) REE依存型メタノール代謝の鍵酵素はLa-MDH (XoxF1) である 私たちはREEにより生育が著しく賦活化される菌株 *Methylobacterium* sp. を自然界から見だし、全ての *Methylobacterium* 属細菌がREE依存的なメタノール生育を示すことを証明してきた。そこでゲノム情報が公開されている *M. extorquens* AM1 株のLa-MDHを解析したところ、機能未知因子XoxF1であった。また、主要MDHとされてきたCa-MDH (MxaFI) の欠損は確かにメタノール/Caに生育できないが、メタノール/Laには良好な生育を示した。一方、 $\Delta xoxF1$ 株はメタノール/Laにほとんど生育しなかった。このことから、La依存的メタノール生育に必要なMDHはXoxF1であることが証明された。

2) REEをメタノール生育に要求する細菌群は自然界に普遍的に存在する REE依存的メタノール生育を示す菌株はどこからでも簡単に単離できることから、「REE生態系」は普遍的に存在する極めて一般的な生態系であることが分かる。また *Methylobacterium* 属細菌以外にも根粒菌、メタン酸化細菌、光合成細菌など様々な細菌群がXoxFのオーソログ遺伝子を持つことが報告され、XoxFとREE依存型メタノール代謝系が自然界に広く分布する一般的な代謝系であることが明らかとなってきた。特に *Methylobacterium* 属細菌や根粒菌など、植物共生菌がREE依存型メタノール代謝系を活用していることが興味深い。彼らはREEを利用することで植物の生育や代謝を邪魔することなく、常にREE依存的メタノール代謝を行える環境下で生存していることが想像できる。今後、REEが微生物と植物の共生関係の鍵を握る因子としての役割を証明できればと考えている。

ヨウ素 (I) はヒトを含めた脊椎動物にとって必須元素であり、甲状腺ホルモン (T3, T4) の構成成分として重要な役割を担っている。ヨウ素の欠乏は発育不全や知能障害、甲状腺肥大などを引き起こす。ヨウ素には安定ヨウ素 (I-127) の他にI-129 (半減期: 1,570万年) やI-131 (半減期: 8日) といったいくつかの放射性同位体が存在し、核燃料の再処理や核実験、原発事故に伴い環境中に放出されている。特に長寿命のI-129は、長期的には安定ヨウ素と同じ挙動を示すことから、人体の甲状腺へ濃縮する可能性がある。このため、I-129の安全性を評価する上でもヨウ素サイクルを理解することは重要である。ヨウ素の主な化学形態としてヨウ素酸イオン (IO₃⁻)、ヨウ化物イオン (I⁻)、有機態ヨウ素が知られている。最近になって、これらヨウ素の化学形態変化がバクテリアなど微生物の影響を受けることがわかってきた。本発表ではバクテリアによるヨウ素の揮発、濃縮、酸化、還元、および脱ヨード化反応について紹介する。特に、ヨウ素を細胞内に5,000倍以上濃縮する *Arenibacter*、高ヨウ素環境で優占して生育するヨウ素酸化細菌 *Iodidimonas* や *Roseovarius*、ヨウ素酸を嫌気呼吸に用いる *Pseudomonas* などは、生育や代謝にヨウ素を必須とするヨウ素栄養性細菌 (Iodotrophs) の存在を示唆している。原始海洋は還元的で、ヨウ素濃度は現在の100倍も高かった。およそ27億年前、光合成生物の出現により原始海洋中に初めて活性酸素種 (ROS) が生じたと考えられる。ヨウ素は必須元素中で最も電子リッチであり、還元力に富む。このためROSに曝露された原始生命が、現在では一般的な抗酸化物質や抗酸化酵素を獲得する前、ヨウ素を用いてROSを解毒した可能性がある。その後、生命が海水から淡水、陸上に進出するに従ってヨウ素欠乏が生じ、これが甲状腺のようなヨウ素を貯蔵する特別な器官の進化へと繋がったのではないかと推測される。本発表では、このような生命とヨウ素のダイナミックな共進化の歴史、そこで演じられた微生物の役割についても大胆に推測 (妄想) してみたい。

池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫 (広島大・先端物質)

ケイ素 (シリコン, Si) は酸素に次いで地殻上に二番目に多く存在する元素であり、産業的にも広く利用されている。多くの生物にとっては馴染みの薄い元素だと言えるが、一部の真核生物 (珪藻や放散虫、一部の海綿や一部の高等植物など) は可溶性のケイ酸 ($\text{Si}[\text{OH}]_4$) の形で Si を積極的に取り込み、その重合体である固体のシリカ (SiO_2) を骨格や殻などとして利用することが知られている。その一方で、原核生物と Si の関わりについてはこれまでほとんど報告がなかった。多様な代謝系を有する原核生物の中には、環境中に豊富に存在する Si を積極的に利用するものもいるのではないかと、この考えのもと、当研究室では Si を利用する細菌の探索を開始した。培地に添加したケイ酸の取り込みを指標にスクリーニングを行ったところ、土壌より単離した 240 株のうち 29 株 (約 12%) という意外なほどの高頻度でケイ酸の取り込みが認められた。16S rRNA 配列に基づく系統解析の結果、ケイ酸の取り込みを示した株は全て *Bacillus* 属に属し、特に *B. cereus* に近縁なものが多かった。*B. cereus* をモデルとして解析を行った結果、本菌が胞子を形成する時期にケイ酸が細胞内に取り込まれ、細胞内で重合されてシリカとして胞子表面に蓄積されることを発見した。蓄積されたシリカは、胞子殻 (spore coat) と呼ばれる多数のタンパク質で構成される層とその近傍に局在し、胞子の酸耐性を向上させることも明らかとなった。胞子を酸処理に供して有機物を分解した後、残存するシリカを電子顕微鏡で観察したところ、胞子サイズの殻状の構造体が認められた。これらのことから、胞子を覆う形でコーティングしているシリカ層が、酸に対する防壁として機能していることが示唆された。Si を利用することで酸性条件下における自身の生存率を高めるという独自の生存戦略だと考えられる。また、本菌のシリカ蓄積メカニズムを解析する過程で、胞子殻に存在するタンパク質のひとつである CotB1 がシリカ蓄積に関与していることを明らかにするとともに、本タンパク質の機能領域の配列を基に新規のシリカ結合ペプチドを開発した。本ペプチドを利用することで、安価なシリカ粒子を担体としたタンパク質のアフィニティー精製法の開発も進めており、本発表ではこれらの応用展開についても紹介したい。

セシウム (Cs) は第1族・アルカリ金属に属する元素である。同族の元素の中でも、特にカリウム (K) と物理学的性質やイオン半径が類似している。Csは地殻中に数ppm、一般土壌中には数ppb程度存在する、比較的レアな元素である。セシウム (Cs) の放射性同位体は核廃棄物等に由来する放射能汚染の主要な原因物質であり、その環境中での動態や環境からの除去技術が注目を集めている。Csは生物にとって非必須元素とされているが、生物はKの輸送系を介して非特異的にCsを取り込むことが知られている。本講演では、生体内に入ったCsの生理的意義、および非特異的なCs取り込み活性を利用した放射性Csのバイオレメディエーション技術の可能性、について我々の近年の報告をもとに概説する。【1】Csの細胞毒性と耐性微生物の発見：高濃度のCs⁺は必須元素であるK⁺の欠乏を引き起こし、(微)生物の生育を阻害することが知られている。我々は高濃度のCs⁺に耐性を持つ微生物、*Flavobacterium* sp. 200Cs-4株の分離に成功した。この株は大腸菌、枯草菌、および近縁の*Flavobacterium*属細菌の増殖が完全に阻害される200 mM Cs⁺の存在下でも旺盛な増殖を見せた。細胞内Cs⁺濃度の分析により、この株は高濃度のCs⁺存在下でも細胞内Cs⁺濃度を低く保つ能力を有していることが明らかとなった。【2】CsによるK欠乏下の増殖不全の解消：一方で我々は、ある限定的な条件ではCs⁺が微生物の生育にポジティブな影響を与えうることを見出した。Cs⁺の非特異的輸送活性を持つ大腸菌K輸送タンパクKupの誘導発現株を作製し、K⁺欠乏・Cs⁺添加条件で生育試験を行った結果、Kupの発現量、細胞内Cs⁺濃度、およびK⁺欠乏条件での生育の間に明確な正の相関が確認された。この結果は、K⁺の細胞内必須機能の少なくとも一部をCs⁺が代替可能であることを意味している。【3】K輸送タンパクの人工進化による大腸菌のCs取り込み能向上：ランダムに変異を導入したkup遺伝子を発現する大腸菌変異株ライブラリーを作製し、K⁺欠乏・Cs⁺添加条件で生育が向上する株、C1とC2を得た。この2株は10 M K⁺、10-100 M Cs⁺の条件で、大腸菌野生株と比較して最大で46倍ものCs⁺取り込み能を示した。C1にはE80G、C2にはD283N、T374AおよびT512Aのアミノ酸置換が確認された。2菌株共に酸性アミノ酸に変異が入っており、そのCs⁺に対する親和性・特異性への寄与が示唆された。

磁性細菌は、地磁気を感知し、べん毛を用いて地磁気に沿って遊泳することで、生育に適した微好気的な環境へと効率的に移動する。磁性細菌は、磁気センサーとして機能するマグネトソームとよばれる原核細胞オルガネラをもつ。マグネトソームは、細胞質膜が貫入して生じた膜小胞の内部で、磁鉄鉱（磁石）の結晶が生合成され、形成される。マグネトソームは、細胞の中央に直鎖状に配置されることで、効率的な磁気センサーとして機能する。このマグネトソームの直鎖状配置は、磁性細菌ゲノムに保存されたアクチン様蛋白質MamKからなる細胞骨格繊維とマグネトソームとの相互作用により保たれている。私たちは、生細胞蛍光イメージングを用いて生きた磁性細菌細胞内のマグネトソーム動態を観察し、MamK細胞骨格がどのようにマグネトソームの機能を支えているかを調べた。本発表では、磁性細菌のマグネトソームについて紹介するとともに、細胞骨格によるマグネトソームの配置機構についての研究結果を紹介する。本研究では、全反射蛍光顕微鏡を用いて、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の細胞周期全体にわたるマグネトソームの細胞内動態を高時間分解能で観察した。野生株と *mamK* 欠損株のマグネトソームの局在と動態を比較すると、野生株では、マグネトソームは細胞中央に直鎖状に細胞周期を通じて固定されていたのに対し、*mamK* 欠損株では、マグネトソームは凝集体をつくり細胞内の偏った位置に存在するか、ランダムに分散し移動する様子が観察された。また、*mamK* 欠損株細胞内のマグネトソームの拡散定数は、リボソームなどの細胞内を単純拡散する分子と同等であった。このことから、MamK細胞骨格は、マグネトソームを細胞中央に直鎖状につなぎとめることで、マグネトソームの分散を防ぎ、安定な構造をもつ効率的な磁気センサーとして機能させていることが明らかになった。また、*mamK* 欠損株では、マグネトソームは娘細胞に不均等に受け渡されており、娘細胞へのマグネトソームの均等分配にも、MamK細胞骨格が必要であることが明らかになった。

チラコイドは光合成電子伝達反応を行う場であり、シアノバクテリアから植物の葉緑体まで広く保存されている。シアノバクテリア自体が植物細胞のオルガネラである葉緑体と類似しているが、見方を変えれば、その中にあるチラコイドも葉緑体にとってはオルガネラ小器官、シアノバクテリアにとっては細胞小器官と捉えることが出来る。そのチラコイドの構築について、チラコイド構造がまったく存在しない状態から新規合成される仕組みはわかっていない。これは、光合成生物が通常生育している環境ではチラコイドがまったくない状態がみられないためである。例えば植物細胞では、光が当たっている細胞では葉緑体が存在し、チラコイドが発達している。これらの細胞は細胞分裂により葉緑体を分け合い、また葉緑体自身も分裂により増えるため、ゼロから葉緑体ができることはない。暗所で生育した芽生えでは葉緑体ができずエチオプラストが存在しているが、エチオプラスト内にはプロラメラボディと呼ばれる内部構造が存在し、これに光が当たることによってクロロフィルの合成、ひいてはチラコイドへの転換が行われるため、全くの新規合成とはいえない。シアノバクテリアでも、チラコイドの新規合成は見られない。シアノバクテリアは分裂によって増殖するため、分裂の度に既に出来上がっているチラコイドを分け合う。また、基本的に暗所では生育できないため、これまでチラコイドの新規合成は観察されていなかった。我々は、シアノバクテリアを生育する培地中の窒素含量を調節することで、チラコイド構築機構の解明を試みている。シアノバクテリアを窒素欠乏条件で培養するとチラコイド構造が衰退するが、その後窒素十分条件に戻すことによってチラコイド構造が回復する。その際の生化学的変化を調べたところ、まず呼吸活性が上昇し、およそ15時間後に光合成タンパク質の蓄積が顕著となることがわかった。一方、チラコイドのおよそ半分を占める膜脂質の蓄積はそれよりも遅く(24-36時間後)、タイムラグがあることが明らかとなった。このことから、チラコイド再構築過程では先にタンパク質群が細胞膜に蓄積し、その後膜脂質が合成されることでチラコイドが形成されると考えられた。本講演では、生存戦略としてのチラコイド構造の意義を議論する。

極めて低い栄養条件で生育可能な細菌群をオリゴトロフ(oligotroph)と呼ぶことがある。演者らは一般細菌用のニュートリエントブrosを1/100~1/1000に希釈したものを使用して、様々な環境からオリゴトロフの単離を試みているが、炭素源を全く含まない無機塩培地を用いても、実に簡単にオリゴトロフを単離できることに驚いている。それらの微生物は培養環境中からCO₂を除去すると生育を示さない場合が多く、大気中のCO₂を利用して生育していることは確かであるが、独立栄養性細菌の培養に必須である光、金属などのエネルギー源を添加しなくても生育する。このような「超低栄養性細菌」のうち、現在最もよい生育を示す*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株について詳細に研究を進めている。N9T-4株のCO₂固定経路の完全解明には至っていないが、低栄養生育・代謝については徐々に明らかとなっており、アセチル-CoAを中心としたC2代謝が鍵であることが示唆されている。また、興味深いことに培地から窒素源・硫黄源を除いてもほとんど変わらない生育を示す。このうち低栄養的窒素代謝についてはほぼ明らかとなっており、大気中の微量アンモニアを取り込んで生育する。よく分からないが、非常にユニークな生育特性を示すと言うのが現状のN9T-4株であるが、細胞内構造も特徴的なものが見いだされた。電子顕微鏡観察の結果、低栄養条件で生育させた細胞に1つずつ、比較的大きな(約100 nm)、球形で綺麗な細胞内構造体が観察できた。富栄養条件(LB培地)で培養した場合にはこの構造体は見られないか、あるいは非常に小さいものとなっていた。低栄養特異的なオルガネラを発見したと躍起になって「オリゴボディー」と名付け解析を始めたが…オリゴボディーの構成成分を調べた結果、無機ポリリン酸(polyP)が蓄積していることが明らかとなった。polyPの顆粒が細胞内に形成されることは珍しいことでなく、アシドカルシソームとして古くから知られている。これは本シンポジウムで議論すべき課題でもあるが、アシドカルシソームはバクテリアからヒトまで存在する唯一の「オルガネラ」だとされている。本シンポジウムでは、このオリゴボディーの形成条件などについて、N9T-4株の炭素・窒素代謝における最新の知見と合わせて紹介したい。

S-070

ヒドラジンを合成するオルガネラ：嫌気性アンモニウム酸化細菌のアナモキソソーム

押木 守¹, 岡部 聡² (¹長岡高専・環境都市, ²北大・院工)

嫌気性アンモニウム酸化(anammox)細菌は1990年代に廃水処理リアクターから発見された細菌であり、アンモニウムを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として窒素ガスを生成する代謝によって自身の増殖に必要なエネルギーを生産している。Anammox反応の極めてユニークな点は中間代謝物としてヒドラジン(N₂H₄)を生成する点にある。ヒドラジンはロケットエンジンの液体燃料として利用されているほど反応性に富む物質であり、ヒドラジンの生合成を行う代謝能は現在までのところanammox細菌のみでしか見いだされていない。Anammox細菌は系統学的にPlanctomycetes門に属する細菌であるが、Planctomycetes門細菌は一般的なグラム陰性・陽性細菌とは大きく異なる細胞構造を持つことが知られており、anammox細菌も例外ではない。すなわち、anammox細菌の細胞は外側から、paraphoplasm、riboplasm、anammoxosome(アナモキソソーム)の3画分から構成され、アナモキソソームは直径500-800nmにおよぶ巨大なオルガネラである。前述のヒドラジン合成を含むanammox反応はこのアナモキソソームで行われていると考えられており、anammox細菌の生き様を考える上でアナモキソソームの機能を解明することは大変興味深い。また、アナモキソソームはラダラン脂質(ladderane lipid)と呼ばれる、これもanammox細菌のみでしか見いだされていないユニークな脂質によって構成されるという特徴を持っている。Anammox細菌は現在なお純粋培養の成功していない難培養性の微生物であり、遺伝子ノックアウトのように洗練された分子生物学的手法ではなく、ゲノム情報からの代謝予測や天然タンパク質の分離・精製といった手法によって、anammox反応やラダラン脂質合成の代謝様式が推定・同定されている。著者はanammox細菌の生理学的特性の解明にこれまで携わり、本細菌の生き様を観察してきた。シンポジウムでは本細菌がどのような特徴を有する細菌であり、anammox反応がどのように触媒されるかについて、近年の成果を中心に紹介したい。

オルガネラの定義とは一体何であろうか？仮に「細胞の内部に区画されて存在し、特化した機能を有した構造体」と定義した場合、真核細胞だけではなくオルガネラは幾つかの原核細胞にも存在する。真核細胞のミトコンドリアや葉緑体と同様に、原核細胞に存在する区画された構造体は、細胞質とは異なる成分を含んでおりオルガネラ独特の機能を有している。それでは、中身が何もない構造体はオルガネラなのか？幾つかの微生物は、外殻が疎水性タンパク質で構成された「ガス小胞」を形成する。親水性の細胞内液はガス小胞内に浸透できないことから、ガス小胞内には細胞内で溶けていたガスが蓄積している。ガス小胞は光合成を行うシアノバクテリアやロドプシンを合成するハロアーキアなどの微生物でこれまでに発見されており、微生物細胞の浮力を向上させる運動器官としての機能を有している。このように、特殊な機能を細胞に付与するガス小胞はオルガネラと呼べる構造体であろう。ガス小胞形成は光を必要とする微生物で多く発見されてきたが、光を必要としない（光を必要とする機能がまだ発見されていない）細菌でも近年見つかった。腸内細菌科に属する *Serratia* sp. 39006株は、 α -プロテオバクテリアで唯一ガス小胞の形成が確認されている好気性細菌である。驚くことに、本菌はべん毛運動を行う形態（浮浪）とガス小胞を形成し浮上する形態（float）を環境条件によって使い分けることが見いだされた。また、ガス小胞形成時には攻撃的機能（抗生物質生産）や守備的機能（ファージ耐性）が高く、酸素濃度が高い気液界面におけるニッチ獲得に有利な特性を備えることが明らかとなった。ガス小胞形成はべん毛の形成や回転に比べて低エネルギーコストであり、栄養条件が乏しい環境ではコストパフォーマンスの高い運動形態を本菌は利用しているのかもしれない。本発表では、ガス小胞形成を一例として、オルガネラを持つことにより発揮される細菌の生存戦略について議論したい。

地球環境中には膨大かつ多様な微生物が棲息しており、その多く (>99%) が未だ培養されたことない未知の生物であることが明らかにされている。その数は宇宙空間の星の数 (推定 10^{21} 個) よりも桁違いに多く、その実態の多くが不明であること等から、近年では未知微生物を宇宙物理学分野の暗黒物質問題になぞらえて、生物界の暗黒物質 (microbial dark matter) 等と表している。この「生物界の暗黒物質」の謎を紐解く上で、昨今、極めて大きな威力を発揮しているのが環境ゲノム情報解析技術である。次世代シーケンサーの革命的な発展とバイオ情報解析技術の進展により、今日では、環境中の微生物生態系を構成する未知微生物のゲノムを一つ一つ再構築し、その代謝機能を推定することで、これまで以上に未知微生物の実態に深く迫ることが可能になりつつある。このように環境ゲノム情報解析研究が隆盛を極める中で、1890年代に確立された「微生物を一つ一つ培養してその機能を探る」という近代微生物学を支えてきた根源的手法が今、改めて見直されつつある。というのも、未知微生物が本来もつ深遠な未知機能を発掘するためには、環境ゲノム情報だけでなく分離・培養というアプローチが必要不可欠であるという認識が広まりつつあるからである。我々も、環境ゲノム情報解析技術を活用しながらも、数十年にわたって環境中の未知微生物を培養しその生理生態機能の解明を進めてきた。特に最近では、陸域地下圏環境、湧熱水環境や廃水処理プロセス環境、さらには水生植物共生系や腸内環境に棲息する未知微生物の実態解明研究に取り組んでいる。本講演では、培養することで初めて明らかとなった新生物機能の発見の事例や、環境ゲノム情報と培養技術を組み合わせて実証した未知アーキアの生態機能に関する知見を紹介しながら、「未知の微生物を"培養"して生命の新機能を探る」というアプローチの重要性と今後の可能性について議論したい。

地球表層の約7割を占める海洋の下には、海水中の総微生物細胞数に匹敵するほど多くの微生物細胞が生息する「海底下生命圏」が広がっている。これまでの遺伝子解析技術を用いた調査結果から、海底下生命圏は多種多様な微生物種により構成され、その多くが分類学上高階位である門、綱や目レベルで分類株がないグループ、所謂「微生物暗黒物質 (microbial dark matters)」に属していることが明らかとなっている。従って、地球における物質循環の包括的な理解および新たな微生物資源を獲得するためには、微生物暗黒物質を含めた海底下微生物を培養あるいは分離し、その詳細な特徴を捉えることが重要な課題の1つとして認識されている。しかしながら、海底下微生物の培養は従来の方法 (例えば試験管等を使ったバッチ式培養法) では経験的に難しいことが知られている。このような背景から、私は、この10年の間、様々な培養法を開発・導入することで海底下微生物の培養に取り組んできた。中でも、環境工学分野の排水処理技術を参考にしたリアクター培養システムの開発と海底下微生物の培養化への利活用に関する研究に注力してきた。下水や産業排水を処理するために、これまで様々な形式のリアクターが考案されているが、私はスポンジを微生物の固定化担体とした下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge: DHS) リアクターを主に用いている。その理由として、(1) スポンジを固定担体として用いるため、増殖が極度に遅い海底下微生物群をリアクター内部に長期間に渡って保持することが可能である、(2) DHSリアクターを含めたリアクター培養は低濃度の基質を連続的に供給することができるため、より環境に近い条件で培養が可能である、そして (3) リアクター培養は水の流れにより代謝産物による増殖阻害の軽減できること等、が挙げられる。実際に、DHSリアクターを用いて数年間に渡る長期培養を行った結果、海底下2 kmの石炭層からメタン生成微生物群集や海底堆積物から嫌氣的メタン酸化反応を行う微生物群集等の集積培養に成功している。さらには、リアクター集積培養物から微生物暗黒物質に属する様々な嫌気性微生物を獲得することに成功している。本発表では、このリアクター培養システムを駆使して海底下微生物の培養に成功した事例を紹介しながら、リアクター培養法の利点と今後の展望について触れたい。

鈴木 志野 (JAMSTEC・高知コア, J. Craig Venter Institute, University of Southern California)

"地球上には多様な環境が存在し、そのほぼすべてに生命は存在する。これは生命の誕生後、地球環境の劇的な変遷に曝されてもなお、柔軟に適応し、多様性を創り出した結果である。一方、様々な物理化学的要因により、生命活動に必要なエネルギーが獲得できない、生体分子が安定して存在できない等の理由から、生命が息できない環境も存在する。生命圏と非生命圏の境界部は、ある物理化学的因子において最も選択圧がかかる極限的な環境であり、その環境で生命を維持するには、何らかの適応進化が必須となる。我々は米国The Cedarsにおいて、水素を多く含む超塩基性 (pH = ~12)、超還元性 (Eh = ~700 mV) 蛇紋岩化流体に生息する微生物の研究を行ってきた。そこには、有機炭素、主要な電子受容体、リン酸・炭酸水素イオンなどがほとんど存在せず、既存の知識では生命の生存機構を予測できない。実際、The Cedars深部蛇紋岩化流体に生命の存在は確認されているものの、細胞数は検出限界 (102 cell/mL) 以下であり、地球上の極限生命環境の一つであると考えられた。生命はどのような生存戦略により、この極限生命環境に適応したのだろうか？この問いに答えるため、我々は環境中に優占する微生物の分離培養、環境ゲノミクス、ゲノムビニング、トランスクリプトミクス等を行い、この生態系における適応進化の全体像の解明を試みた。ゲノム解析からは、系統門に関わらずゲノムサイズの小さい微生物群により構成される生態系であることなどが明らかとなり、これはDNAの材料となるリン酸の利用が困難であることへの生存戦略だと考えられた。また、培養からは至適pHを11-11.5に持ち、水素をエネルギー源とする微生物群が単離され、これらは未知のアルカリ適応機構によりこの極限環境に適応している可能性が示唆された。今や環境中での微生物の増殖速度までも、塩基配列解析から推定できる。一方で、ゲノム配列解析により得られる情報は既存の知識に基づく推測であるため、未知の生命圏においては、何らかの培養解析により新規機能を明らかにする必要がある。我々は、ややもすれば解析手法に踊らされがちであるが、微生物のゲノムも生理性状もその生命（群）の一面である。よって、培養とゲノム解析双方から得られた情報を正確に理解し、それらを有機的に融合し、生命の真の理解につなげていくことが重要である。"

分子生物学的手法の発達に伴い、様々な環境の微生物生態が解明された結果、自然界には莫大な数の微生物が棲息し、その多くが分離・培養に至っていないことが明らかにされた。言い換えれば、我々人類の生活を豊かにする可能性を秘める微生物が、地球の至るところで人知れず眠っていることを意味する。近年では、メタゲノム解析やシングルセル・ゲノミクスなどの開発・進歩により、微生物を培養することなしに、生理機能や生態的役割を解明することが可能となりつつある。しかし、鋳型となるゲノムDNAを恒久的に再利用可能な状態で保存・維持することは困難であり、研究・開発の発展に大きな障壁となる。すなわち、永続的に微生物材料や遺伝子材料を利活用するためには、微生物を培養可能にし、安定なバイオリソースとして保存・維持することが最善の方法である。未培養性微生物を培養可能にすることは、応用研究を進展させる貴重なリソースを充実するだけでなく、新たな未培養性微生物を獲得するための有益な知見を得ることができる点でも意義深い。以上の背景から、筆者らは、温泉および海洋環境を中心に新たな未培養性微生物の分離・培養を試みてきた。日本各地から温泉熱水、バイオマット、海洋棲生物などを収集し、集積培養や直接寒天平板培養法を用いることで、309株の新規微生物 (アーキア、細菌) を純粋分離した。分離株の1/3に相当する103株は既知種との16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性が95%以下、1割強の37株に至っては90%以下であった。また、高次分類群レベルで分類すると、分離株は14門に属し、新規性の高い多様な微生物を分離・培養できたと考えられた。これら分離株のうち、35株の形態学的特徴、生理・生化学性状、化学分類学性状等を解析し、現在までに1綱4目5科12属28種の新規提唱を行なった。また、2株の完全長ゲノム配列を解読した。本発表では、陸上温泉郷に発育したバイオマットから分離した *Ignavibacterium album* と石油備蓄基地で収集した原油から分離した *Prolixibacter denitrificans* を中心に、未培養性微生物の分離・生理機能解析・ゲノム解析を通して、明らかになった知見を紹介したい。

昔話をしよう。かつてイエローストーン国立公園の温泉微生物マット中でクロロフレキシ門に属する赤い繊維状細菌が発見された。この赤い奴は光従属栄養的に生育しているものと予想されたのだが、その分離培養は遅々として進まなかった。光従属栄養条件で培養すると、似たような生き方をしているクロロフレキサスって邪魔者が優占してしまうからだ。で、研究者達は「分離は困難」と判断し、生態学的研究に終始するわけ。別に分離しなくたって、その手の研究はできるからね。でも「分離できないわけがない」って確信していた男が極東にいて、そいつを分離しようと無い知恵を絞っていた。当然、光従属栄養条件で培養し、寒天培地がクロロフレキサスに席卷される悲しい憂き目にも会っている。で、温泉で日がな一日微生物マットを見つめて、分離法を思いつく。それはとても単純な思いつきだったが、それによって分離に成功したわけだ。分離培養の進展を阻害しているのは、「分離出来ない」って思い込み以外の何ものでもないってことなんじゃないかな。じゃあ、ここからが本題だ。って、これまでは前置きだったのか(´□`;)!! まあまあ、ひとつ思考実験をしてみようじゃないか。リン酸緩衝液と基礎塩類、ビタミン、そして窒素源である硫酸、それに炭素源として炭酸ガスだけを加えた培地を作ったとする。これを嫌気条件で培養すると何が生育する？ 何も生えてこない。エサ(電子供与体)がないのだから、当然だ。じゃあ、これに光を当てたら？ シアノバクテリアや藻類は生えてくる。だって、そいつらの電子供与体は水だからね。では、そいつらが光合成できないように、クロロフィルが吸収する赤色光を含む可視光全体をカットして赤外線だけを当てた場合はどうなる？ バクテリオクロロフィルは赤外光で光合成できる。でも、光合成電子伝達を支える電子供与体がないのだから、いかなる酸素非発生型光合成細菌も生育することはない。だが、それもまた「思い込み」の可能性もある。微生物の生理学的多様性は目を見張るものがあるんだ。曰く、「エネルギーを獲得できるいかなる条件をも、微生物はそれを利用する」だ。果たして、このような条件においても増殖する微生物があるのだろうか？ もしあるのだとしたら、どのような代謝システムを持っているのだろうか？ その答えは、WEBで……あっ、間違った。当日シンポジウムにて(´ー`)ノ

ロイコノストック属細菌 (*Leuconostoc bacteria*) は、発酵食品 (オリーブの塩漬け、キムチ、サラミ、チーズ等) やデキストラン生産などの実用的な用途で使われる重要な乳酸菌であり、「絶対的ヘテロ乳酸発酵」「好氣的に早く増殖」というユニークな特性を持つ。ロイコノストック研究の基盤を整備するために、まずは標準株である *Le. mesenteroides* ATCC8293 の pH 適応機構を研究した。酸、あるいは、アルカリ性の培地において好氣的に培養し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、限られた遺伝子の転写のみが変動し、その多くが pH 適応に重要である「代謝」「プロトン共役型 F₁F₀ ATP synthase」「Na⁺/H⁺ antiporter」「細胞表層形成」に関わる遺伝子であることがわかった。Catalase や Superoxide dismutase を持たない乳酸菌が好氣的に増殖する場合、活性酸素を除去するために細胞内へのマンガンの蓄積が必要であることが知られているが、ロイコノストックが有する 3 種のマンガン・トランスポーター遺伝子の転写は pH 依存的に変動していた。つまり、どの pH においても効率的にマンガンを取りこむために、3 つの中から pH に適したトランスポーターを選択する機構が存在していると考えた。転写開始点を決定し、転写産物の 5'UTR (untranslated region) を解析した結果、一つのマンガン・トランスポーター遺伝子には、pH とマンガンに反応して下流の遺伝子の転写を制御する「*yybP-ykoY* リボスイッチ」が存在することがわかった。面白いことに、全てのマンガン・トランスポーター遺伝子を含む、pH 依存的に転写変動する多くの遺伝子の 5'UTR には、リボスイッチに特徴的なパルンドローム配列を含んでいた。また、よく保存されているが機能未知のリボスイッチ候補 *ykkC-yxkD* も見られた。これらの結果は、pH 依存的に変動する遺伝子の 5'UTR が、細胞内 pH を感知して転写制御を行うリボスイッチとして働き、酸・アルカリ条件への適応に重要な役割を担っていることを示唆している。

近年のDNAシーケンサーの技術発展により、微生物の完全長ゲノム配列を決定することは以前とは比較にならないほど早く簡便になった事に加え、メタゲノム解析のような難培養微生物をも対象にした研究が可能になっている。これらゲノム配列だけをターゲットにするのではなく、RNAを対象にしたトランスクリプトミクス、タンパク質を対象にしたプロテオミクス等、環境中の微生物に対してオミクスのアプローチで研究が進められている。環境微生物を扱う研究分野においても、このように取り扱うべきデータ量が膨大になりつつあるのが現状である。こうした状況において、バイオインフォマティクスが担うべき役割は非常に大きい。そこで今回は、情報科学的なアプローチで環境微生物ゲノムを解析した研究についていくつか紹介する。(1) 疾患と微生物叢のメタゲノムワイド関連解析、(2) エンテロスケープ：腸内細菌叢の新規解析手法、(3) 16S rRNA配列からメタゲノム組成を予測するバーチャルメタゲノム法、(4) 藻類のトランスクリプトーム解析、(5) 海洋微生物のプロテオーム解析、(6) 細菌ゲノムの再構成など、環境中に棲息する微生物叢を対象にしたものに加え、単離された環境微生物を対象にしたもの、また、次世代シーケンサーや質量分析といった手法の異なるものなど、時間の許す限り様々な研究例について紹介したい。環境微生物分野とバイオインフォマティクス分野との今後の連携について、ここで紹介する研究例が少しでも役に立てばと期待する。

超好熱菌は90°C以上の高温域で生育可能な極限環境微生物である。これら超好熱菌は産業上有用な耐熱性酵素を産生すること、16SrRNA配列に基づく進化系統樹上で根の近傍に位置し、ユニークな代謝経路や生命維持機構を有していることから興味深い生物である。これまでに多数の超好熱菌ゲノムが解析され、現在ではシーケンシング技術の飛躍的な発展により新規なゲノム解析も容易となっている。しかしながら、ゲノムサイズが小さな超好熱菌においても機能未知遺伝子は未だ数多く存在し、またホモロジーから機能推測できたとしてもその推測が正しいとは限らないことは当然である。一方、超好熱菌の遺伝子操作は長らく困難であったが、2005年に硫黄還元超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* において実用的な遺伝子操作系が開発され、ゲノム情報から見出した遺伝子について破壊による機能解析や高発現による細胞機能の改変が可能となった。これらは遺伝子機能解明において強力な手法だが、操作しても表現型が予測できない機能未知遺伝子は依然として解析が困難である。

大腸菌や酵母、ショウジョウバエなどのモデル生物では種々の表現型の変異株が取得され、その表現型に対応する遺伝子を同定することで遺伝子機能が明らかにされてきた。しかし超好熱菌では変異株の単離が困難であったり、単離しても遺伝子操作ができないために変異遺伝子の同定ができなかったために、このようなアプローチはとられてこなかった。我々は超好熱アーキア *T. kodakarensis* をより深く理解するための新たな解析法として、遺伝子操作技術を用いたランダム変異に着目した。変異体ライブラリーから特定の表現型を示す変異体を取得し、その変異遺伝子を迅速に同定できれば、遺伝子機能について新たな知見が得られると期待できる。これまでにマーカー等を配置したトランスポゾンを用いた *in vitro* 転移させたgDNAライブラリーを作製し、これを用いた相同性組み換えによって *T. kodakarensis* 染色体にランダムにトランスポゾン領域が挿入された変異体ライブラリーを得た。さらに嫌気高温環境で変異株をスクリーニングする培養法を確立し、変異体ライブラリーから温度感受性株や糖代謝変異株などを取得して変異遺伝子を同定している。同定した遺伝子の解析はまだ途上であるが、本講演ではこれら一連の取り組みを紹介する。

金井 保¹, 布浦 拓郎², 石野 良純³, 高井 研², 跡見 晴幸¹ (¹京都大・院工, ²海洋研究開発機構, ³九州大・院農)

ユビキチン(Ub)は真核生物に特有の小タンパク質であり、基質タンパク質との結合(Ub化)を介して、細胞内におけるタンパク質の品質管理に関与する。Ub化が関与する生命機構の代表例は、ポリUb化タンパク質のプロテアソームによる選択的分解機構であるが、近年ではUb化がタンパク質の局在性や活性に影響を与える機構も発見されている。このように多彩な機能をもつUbシステムであるが、その進化的な起源はどこにあるのだろうか?この疑問については、今まであまり語られてこなかったが、その理由として真核生物内におけるUbシステムの高い配列保存性が挙げられる。我々は、未培養系統群アーキアAigarchaeotaに属する'*Ca. Caldiarchaeum subterraneum*'のゲノム上に、真核生物のUbと高い相同性を示すUb様遺伝子(Ubl)が存在することを報告した(1)。本Ubl遺伝子の隣には、Ub化に関与するE1、E2の各相同遺伝子およびRING finger domainをもつE3相同遺伝子が存在し、これらの遺伝子群はオペロン様の構造を形成している。本オペロンの反対側には脱Ub化に関与するDUBの相同遺伝子も存在している。このように真核生物のUb化に関与する全因子を内包する遺伝子群の発見は、アーキアである本菌において真核生物型のUbシステムが存在することを強く示唆する。しかし、当然のことながら遺伝子の発見だけでは、本システムが実際に細胞内で機能していることの証拠とはならない。私たちは、'*Ca. C. subterraneum*'のUblシステムの機能検証が、Ubシステムの進化を解明する上で大変重要な情報をもたらすと考え、その機能解析に着手した。本発表では、その成果について報告する。1. Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G. J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K., and Takami, H. 2011. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 39: 3204-3223.

細菌は、外来DNAをゲノムに取り込み、自らの転写ネットワークに組み込むことで様々な環境に（他の生物が生きていくことができないような環境も含めて）適応していると考えられている。しかしながら、外来遺伝子を取りこむだけで、外来遺伝子が活用可能になるわけではない。我々は、ChIP-chip(ChIP-seq)とトランスクリプトーム解析を用いて、大腸菌H-NSタンパク質が外来遺伝子に選択的に結合し、外来遺伝子の発現を選択的に抑制する因子であることを明らかにした。さらに、比較ゲノム解析を行うことで、転写制御領域における塩基配列の変化、あるいはタンパク質コード領域のアミノ酸置換を伴う塩基置換が、H-NSが結合している領域で有意に高まることを示した。さらに、その配列多様性が、転写制御の多様化をもたらしていた。これらの結果から、細菌が外来遺伝子を転写ネットワークへ組み込み、多様な表現型を示すためには、転写サイレンサーであるH-NSが重要な役割を担うことが明らかになった。今回の発表では、ChIP-seqを含め、本解析に用いたDNA結合タンパク質の機能解析技術と共に細菌のサイレンサーの機能について議論したい

生ゴミや畜産廃棄物などの有機物を肥料として、植物を栽培する…この一見当たり前に見える農業の営みは、自然土壌なしにはあり得ない。月や火星などの他の天体には「土」はあっても、有機物を分解し無機養分に変換する「土壌」はない。また、地球においても、自然土壌以外に有機物を分解し無機養分を生成する機能（土壌機能）を示す媒体は見当たらない。つまり、自然土壌がなければ農業では当然視されている「有機物を肥料にして栽培」が不可能なのである。そのことは裏返すと、土壌機能を人為的に創出する技術がこれまでなかったことも意味する。創出する技術がないということは、土壌微生物を思いのままにデザインしたり、物理性や化学性を好きなようにデザインすることもできなかったということの意味する。できることと言えば、堆肥や肥料を鋤き込む改良技術で、特に生物性に関しては自然任せにするしかなかった。しかしもし、好きに選んだ媒体に、好きに選抜した微生物を生息させ、土壌機能を再現することができたとしたら？土壌の物理性・化学性・生物性のすべてをゼロからデザインする、「デザイナー・ソイル」という新技術が誕生することになる。この土壌創造技術の基礎になったのは、有機質肥料活用型養液栽培である。本技術は、土壌機能を保ったまま土壌微生物を水中で培養する並行複式無機化法（アンモニア化成と硝酸化成を同時に再現する方法）が開発されたことで、技術的に確立された。土壌粒子を全く含まないにもかかわらず、水中で有機質肥料が無機養分に分解され、植物を育てることが可能である。また、この微生物群をロックウールなどの人工媒体に固定化すると、土壌機能を付与することができる。これにより、土壌粒子以外の好きな媒体に土壌機能を再現できるようになった。しかし有機質肥料活用型養液栽培では土壌微生物を接種源としていたため、1万種類以上の微生物が含まれていた。これでは生物性のデザインは不可能である。しかし近年の研究で、わずか3菌株で土壌機能を再現することに成功した。いよいよ「デザイナー・ソイル」の基礎技術が揃いつつある。多くの研究者の協力を得るために、本技術の詳細をこのシンポジウムで紹介したい。

ブドウ根頭がんしゅ病は、植物病原細菌 *Rhizobium* (= *Agrobacterium*) *vitis* (以下、根頭がんしゅ病菌) によって植物の根や茎などにがんしゅ (癌腫) と呼ばれるこぶを形成する土壌病害で、本病は樹の生育不良や枯死の原因となる。根頭がんしゅ病菌は土壌中に生息していることから、定植したブドウが繰り返し発病するといった長期的な被害が出るため、農業生産現場にとって深刻な問題である。そのため、これまで世界中の研究者がブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗微生物の探索を行ってきたが、実用化された菌株はまだ存在しない。土壌消毒による防除が困難なことから、ブドウ生産現場では発病を防ぐ有効な手段がないのが現状である。ブドウは生食用、ワイン用、加工用と幅広い用途で我々の食を支える重要な果樹であり、世界的には特にワインの原料としての需要が高い。本病はワインブドウ生産でも深刻な被害を与えており、本病の防除技術開発は世界中の要望の高い極めて重要な課題である。我々は非病原性 *R. vitis* の中に根頭がんしゅ病の発病を抑制する能力を持つ特定の菌株群を発見した。これらの菌株と根頭がんしゅ病菌を等量混合して植物に接種すると、根頭がんしゅ病菌による癌腫の形成が著しく抑制された。この癌腫形成抑制効果の最も高い菌株として、ARK-1株を選抜した。ARK-1株の懸濁液にブドウ苗木の根を浸漬することによって、定植1年後の本病の発生を強く抑制することを確認した。また、その防除効果は圃場レベルの試験においても安定的であり、リンゴやナシなどブドウ以外の果樹類で発生する本病についても同等の防除効果を示した。ARK-1株はブドウの根の内部で少なくとも3年間定着できる内生細菌であり、ブドウ体内で根頭がんしゅ病菌の増殖を抑制するだけでなく、病原細菌の病原性関連遺伝子の発現を抑制するというユニークな防除作用機構を有する。近い将来、世界初となるブドウ根頭がんしゅ病を防除できる生物農薬の開発を目指して研究を進めている。

1. 研究の背景

CDUは、1分子中に2個の尿素残基を持つ縮合型尿素肥料である。約10年前、生産者の間に「CDUを使うと、色々な病気が出にくい」という声と同時にそれを否定する声があることを知った。これは、土壤中CDU分解微生物群が発病抑制に関与しており、その集積状況が病害防除効果を左右するのではないかと考え、土壤中の微生物群の動態解析のモデルのひとつとして取り上げてきた。

2. CDU分解菌同士の拮抗による防除効果の消失

ハウレンソウ萎凋病をモデルとして、CDU施用による病害の軽減を調べ、病原菌である*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (Fos) に拮抗能を持つCDU分解菌を単離した。

続いて、CDU施用とCDU分解菌接種が病徴発現に対する効果を検討した。バルク土壌及び植物根のCDU分解バクテリア数は、(Ⅰ)CDU分解菌がCDU施用で集積され、(Ⅱ)接種菌は、CDU施用により優占できるが、(Ⅲ)CDU施用のみでは接種菌とはコロニー形態が異なるCDU分解菌が半数を占めた。また、接種菌類似コロニーからの単離株はいずれもFosに対する生育抑止能を持っていたが、非類似コロニーはFosへの拮抗能がなく、逆に接種菌に対して抑止能を持つことから、CDU施用のみでは土着のFos抑制能を持つCDU分解菌が集積されるものの、同時に集積される他のCDU分解菌群により、総合的にFos抑止能が無効化されると考えられた。

3. アブラナ科ネコブ病に対するCDU施用の効果

CDU添加/CDU分解菌接種培土で育苗したハクサイ苗を、培土ごとCDUを施用したポット土壌に移植した。このとき、ハクサイ苗株元にネコブ病菌休眠胞子を接種するとCDU施用やCDU分解菌接種の有無にかかわらず激しく発病したが、ポット辺縁部に接種すると発病が顕著に軽減された。この原因として、辺縁部への接種では、休眠胞子密度が高い部位まで根が伸長する間に土壌中にCDU分解菌が集積され、休眠胞子あるいは一次遊走子に何らかの影響を及ぼしたと考えた。なお、この実験では、施用接種したCDU分解菌による発病抑止の上乗せ効果はなかったため、培土中で集積された土着のCDU分解菌群の効果によるものと判断した。

4. 終わりに

以上のように、CDU系肥料の施用で土壌中に集積された土着CDU分解バクテリア特性に従い、土壌全体として病害防除能を持つ場合があることが明らかになってきた。集積される分解菌群の特性を知ることによって発病予察技術への応用が期待できる。

アジアでは、植物に特異的に養分を供給する微生物のバイオ肥料としての利用研究が積極的になされており、イネ、サトウキビ、トウモロコシ等を対象にした非共生型の窒素固定菌のバイオ肥料としての利用や、野菜等を対象にしたリン、カリウムの溶解菌利用等が揚げられる。しかし、これらのバイオ肥料は、温度や乾燥ストレスで品質の維持を保証できない等の問題があった。そこで、私たちは、芽胞形成窒素固定微生物に着目し、製剤の作成が容易で廉価、かつ、少なくとも製品の品質維持が1年以上できるという、化学肥料と使い勝手が同じで、今まで世界市場に存在していない全く新規の水稻用のバイオ肥料開発に挑んだ。農工大畑土壌から分離した*Bacillus pumilus* TUAT1株をキャリアに保持させたバイオ肥料を作成し、水稻への接種試験を2008年度より開始した。その結果、本バイオ肥料の施用により、施肥量を削減しても慣行と同等の収量を維持できる可能性が示唆された。2010年度からは、本バイオ肥料施用効果の研究所内および現地での圃場試験を実施した結果、(日)本バイオ肥料施用により10~30%増収し、増収の要因は根域の増加に伴う、穂数の増加であった、(月)本バイオ肥料は水稻根域拡大を促進し、土壌中の窒素成分を効率的に吸収した、(火)20~30%窒素肥料を減肥しても慣行施肥条件と同程度の収量が得られた、(水)本バイオ肥料は、苗箱施用で、イネの発根を促進した。2011年度からは、(木)ケイ酸質資材をTUAT1株のキャリアとした新規バイオ肥料の開発を開始し、(金)TUAT1菌株芽胞を原料として、苗箱施用を前提とした剤型を検討し、プロトタイプとなる粒状肥料を開発した。2012年度から2013年度にかけては、(土)製剤を用いた苗箱施用技術開発と本田での効果試験、さらには長期保存試験、及び大量培養技術検討を行い、(祭)長期保存に関しては25°Cの環境下で1年以上経過しても微生物の生残数には変化が無く効果が持続する、画期的な結果を得た。2014年度から農林水産省の平成26年度「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」[実用技術開発ステージ]に*Bacillus pumilus* TUAT1株を対象にした「高機能バイオ肥料を利用した水稻の増収減肥栽培技術の実用化」が採択され共同で、原体微生物の機能解明、資材開発、栽培技術開発、現地実証等の領域で研究が進展した。その結果2016年末にバチルスバイオ肥料「きくいち」が完成し、2017年から試験販売が開始された。

微生物が「発電」する現象は100年以上前から知られていたが、前世紀の終わりに微生物が直接電極へ電子を伝達ことが証明されて以来、微生物の細胞外電子伝達に関する研究は急速に進められてきた。その中心にあるのが微生物燃料電池であり、微生物が有機物を分解・代謝する過程で生じる電子を電極に伝達することで発電することを利用した技術である。微生物燃料電池は、有機化合物の化学エネルギーを直接電気エネルギーに変換できる画期的な技術として、下水など有機性廃棄物処理と同時に「電気を創る」技術として応用が期待されている。当該分野研究は、当然、実用化に向けた応用研究が多数を占めるが、細胞外電子伝達メカニズムに関する基礎的研究についても急速に知見が蓄積している。これまでにc型シトクロムを介した直接的接触、電気伝導性ナノワイヤー、電子シャトルといった電子伝達様式が明らかになってきたが、それらは鉄還元菌を中心とした特定の微生物によるユニークな現象であるかのように考えられがちである。しかし、直接的な電子伝達が異種微生物間でも行われていることが明らかになってからは、自然界でも広く一般的に行われていると考えられ、これまで電子伝達の仲介役として水素と考えられてきた現象を直接的な電子伝達に置き換えた仮説・検証が進められている。微生物間の直接的な電子授受が比較的一般的な現象であるとする、「電子を食べる」側、電子を受け取る側の微生物も多様であり、これまで見出されてこなかった代謝の解明や物質生産への応用が期待できる。電子を食べる微生物に着目した研究として、金属腐食制御や有用物質、バイオ燃料を作らせる微生物電気合成技術に関する研究も急速に進められており、報告例も近年爆発的に増加している。本講演では、微生物電気化学の基本となる微生物燃料電池に関する研究動向に加え、微生物電気化学分野の現状についても概説する。

石井 俊一 (海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター, J. Craig Venter Institute)

近年、微生物と鉱物、電極、あるいは異種微生物間での直接的な電子移動（細胞外電子移動）を利用してエネルギーを獲得する微生物（いわゆる電気を創る微生物＝発電微生物）が相次いで発見されている。このような微生物は、微生物燃料電池を用いた電力生産など、様々な有用技術への応用可能性を秘めている。そこで、近年急速に発展しているシステムゲノミクスの手法を「電気を創る微生物群集」に適用し、発電微生物の微生物群集中の存在頻度、その代謝プロセスと群集内での役割、電子移動のメカニズム、および微生物の使用する電子キャリアタンパク質について、詳細な解析を行った。我々は、発電微生物群集中の全mRNAのシーケンス（メタトランスクリプトミクス）を行う事により、どのような発電微生物が、どのように電気産生を行っているのかを明らかにした。電気産生に関わる遺伝子を容易に同定するため、電極電位を制御し電流値を変化させ、個々の微生物と遺伝子の応答を網羅的に解析する手法を確立した。沿岸汽水域の堆積物を微生物源として、異なる固体表面酸化還元電位にて馴養した3つの発電微生物群集から、9つの異なる発電微生物のドラフトゲノムを決定した。これらの発電微生物は、全て *Geobacteraceae*科あるいは *Pelobacteraceae*科に属し、電子キャリアタンパクとして、マルチヘムシトクロームCをゲノム中に多数コードしている事が分かった。これらの発電微生物の群集中での生き様を遺伝子発現状態から探究すると、発電に使用する栄養基質、酸化還元電位への依存性、発電がストップした際の危機応答、そして発電に使用するマルチヘムシトクロームCが、思った以上に多種多様である事が分かった。この結果が意味する所は、地下環境中には多種多様な発電菌が存在しており、それらは異なる機能を有している、という事である。地下環境とは、固体粒子に封入された嫌気条件の世界であり、それらの固体粒子（主に鉱物）は、様々な電気化学的特性と表面構造を持つ電子受容体として機能すると考えられている。そこには、それぞれの固体表面特性および酸化還元電位に適応し、多種多様なマルチヘムシトクロームCを用いて固体鉱物で呼吸する発電微生物群が存在しており、発電微生物が、鉱物を主体とした地下環境への適応を進めてきた事が伺い知れる。

近年、電極との電子授受（電流）を介してエネルギーを獲得し、増殖する微生物（electrochemically active bacteria; EAB）が相次いで発見されている。EABには*Shewanella*属等の金属還元菌や*Acidithiobacillus*属等の鉄酸化細菌が含まれる。これらの微生物は導電性タンパク質（シトクロムc等）から構成される電子伝達経路（細胞外電子伝達経路）を介して電極と電子の授受を行い、電極を電子供与体、もしくは電子受容体として呼吸を行うことによって増殖に必要なエネルギーを獲得する。EABはその特異な代謝形態から学術的にも興味深い研究対象であるとともに、微生物による電力生産（微生物燃料電池）や、微生物への電子注入による物質生産（微生物電気合成）等の、様々な有用バイオプロセス（微生物電気化学システム）への応用可能性を秘めている。

微生物電気化学システムでは電極電位を制御することによって微生物・電極間の電流量とその方向を変化させることができる。電流はEABの細胞内で行われる酸化還元反応と連動するため、これを利用してEABの代謝を制御することが可能であると考えられる。我々は電極電位がEABの代謝に与える影響を解明するため、*Shewanella oneidensis* MR-1株をモデル菌株に用いて研究を行ってきた。その結果、MR-1株の細胞内異化代謝経路が電極電位に応じて変化することを明らかにした。またMR-1株が電極電位を認識するメカニズムを調べた結果、本株は細胞外電子伝達系を介して電極電位と連動する内膜キノンの酸化還元状態を認識することで異化代謝系の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。この機構を応用すれば、電極電位によって任意の遺伝子発現を促進させ、有用物質の合成を促進させることが可能になると考えられる。

EABについては、近年特に微生物電気合成への応用可能性が注目されている。我々のグループでは*Acidithiobacillus*属細菌の窒素固定能に着目し、電極から供給される電子を利用して大気中の窒素からアンモニアを合成するプロセスの開発を行っている。本講演ではEABの電気化学的な代謝制御を利用したこれらのバイオプロセスの可能性について、我々の研究成果を交えて紹介する。

固体金属中には自由な電子が存在するが、微生物はこの電子を利用することが出来るだろうか？ 金属腐食の分野では、固体金属からイオンが溶解する場をアノード、電子を失う場をカソードと呼ぶ。金属腐食現象は錆として我々の生活の周りで沢山見られるが、金属腐食の一部（大部分？）に微生物が関与していることは一般的にはあまり知られていない。と書くと専門家は熟知しているように聞こえるが、専門家もその全容を把握し切れておらず、アノードに影響しているのか、カソードに影響しているのか、それさえ明確なエビデンスが示されていない。その様な中、演者は、日本国内で分離された鉄腐食性メタン生成菌のエネルギー獲得機構に注目している。というのも、無菌的な環境で金属鉄から電子が流失する速度に比べて、本菌が金属腐食を誘導している時の電子の流失速度は約40倍にもなる。1930年代の古いモデルによれば、嫌気的な環境でカソード上の無生物的に発生した水素を微生物が消費することで、微生物による金属腐食反応が加速するというカソード復極説があるが、水素資化性のメタン生成菌などは金属腐食反応を加速することはない。したがって、鉄腐食性メタン生成菌が起こす加速的な腐食現象は、カソードで電子を積極的に利用していると言えるだろう。さらに、鉄腐食性硝酸塩還元細菌も最近国内で分離されており、こちらの反応も興味深い。というのも、鉄腐食性メタン生成菌は水素資化能を持っており、この水素資化能がカソードでの電子利用に関与していないことを証明するのは難しいが、鉄腐食性硝酸塩還元細菌はそもそも水素資化能を有していない。この鉄腐食性硝酸塩還元細菌の腐食メカニズムの解明は、カソードでの電子利用能について新しい知見をもたらすことは間違いない。最後に最初の問いに戻ると、一部の微生物は固体金属中の自由な電子を積極的に取り出して使うことが出来るようである。このような固体基質からわざわざエネルギーを獲得する意義は不明であるが、このようなエネルギー獲得機構が存在するのであれば、それを掘り下げ、応用に繋がりたいと演者は考えている。

液体として水が存在する環境で起こる金属の腐食には、酸化剤 (O_2 、 H^+ など) が必要である。鉄の腐食を例に示すと、 $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$ のようにイオン化して電子を放出する反応をアノード反応、アノード反応で放出された電子を酸化剤が受け取る反応、 $1/2 O_2 + H_2 O + 2e^- \rightarrow 2OH^-$ (好気環境) や $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (嫌気または酸性環境) をカソード反応という。(日)アノード電流、(月)カソード電流、(火)アノード・カソード間の金属内部を流れる電流、(水)アノード・カソード間の金属外部を流れる電流には、(日)=(月)=(火)=(水)の関係が成り立ち、腐食電流という。鉄では均一腐食 (金属表面でアノードとカソードの位置が近接しており、かつ変動するため一様にすすむ腐食)、ステンレス鋼では局部腐食 (アノードとカソードの位置が固定されている腐食。大面積のカソードから供給される腐食電流が、小面積のアノードに集中するため、重篤な腐食となる場合がある。) が問題になる。好気性環境で起こる微生物腐食として、海水や河川湖沼水で起こるステンレス鋼の電位貴化による腐食がある。微生物が産生する過酸化水素や多価マンガンイオンなどが電位貴化の原因と考えられている。嫌気性の腐食原因微生物としては、硫酸塩還元細菌、メタン生成古細菌、硝酸塩還元細菌などが報告されている。最近、微生物分野でも微生物腐食が注目されているようであるが、研究を進めるのにあたって注意いただきたい点を以下に示す。(1) 微生物以外に腐食原因となる要因はないか精査する。(腐食原因物質、ガルバニックセル形成など) (2) 微生物の鉄腐食性を調べるためには、微生物を単離して、単離微生物ありなしの比較試験をおこなう。(3) 腐食部位の微生物解析は、腐食の結果により増殖した微生物を検出してしまう可能性がある。特にステンレス鋼の局部腐食ではアノードとカソードが離れており、腐食部位の微生物解析のみでは不適である。(4) 微生物が産生する HS^- 、炭酸ガス由来の HCO_3^- などは H^+ の供給源となり、カソード反応を促進する可能性がある。(5) 鉄が腐食すると、 $Fe^{2+} + 2H_2O \rightarrow Fe(OH)_2 \downarrow + 2H^+$ 、 $Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 \downarrow + 3H^+$ のように酸性化が起こる。微生物腐食は微生物学、金属学、電気化学、環境学など複合領域の課題であり、今後、異分野の研究協力が活発化することを期待したい。

生物が利用する炭素の主要な源は大気中の二酸化炭素であり、窒素については同じく窒素ガスである。では硫黄源として利用できるものは大気成分にあるだろうか？海水表層からはジメチルサルファイドが大量に大気へ移行しているが、酸化によって硫酸塩になり、雨水などに溶解してしまうため短時間で大気から取り除かれる。その他の微量に含まれる大気の硫黄化合物も、同様にwashoutされやすいため、硫黄源としての可能性はこれまでほとんど関心を集めることはなかった。大気硫黄化合物の中で唯一の例外は硫化カルボニル (COS, OCSとも書く) である。この物質は対流圏に500 pptv前後の濃度で、全地球的にほぼ均一の濃度で分布しており、その滞留時間も他の大気に見出される硫黄化合物とは大きく異なり、年単位であると報告されている。COSは地球温暖化の将来予測など、大気化学の分野で注目される物質であることから、湿地や海洋などからの放出過程や土壌での消失などについての解明が待たれていた。硫黄酸化細菌を用いた我々の研究により、植物組織などに含まれるチオシアネートを新規酵素であるthiocyanate hydrolase (EC 3.5.5.8)が加水分解することによるCOS生成、並びにそのCOSをcarbonyl sulfide hydrolaseが加水分解し硫化水素が代謝産物として生成されることが、酵素レベルではじめて明らかとなった。さらに土壌には活発にCOS分解を行うことが可能な微生物が高密度で生息しており、大気のコスバランスの維持において重要な役割を果たしていることも明らかとなってきた。さらに同様の活性は原核生物だけでなく、*Fusarium*などの、土壌環境に広く見出される真菌類にも存在し、COSや硫化水素に関連する代謝のひろがりが見出されてきた。一方、動物では硫化水素やポリサルファイドが神経伝達などの重要な生命活動において新規な生理活性を示すことが明らかとなってきており、微生物においてこれまで研究されてきた硫黄循環を中心とする代謝経路との関連が予想される。

微生物は硫酸等を硫黄源としてシステインを生成し、タンパク質だけでなく様々な有機性硫黄化合物の合成に利用している。その有機性硫黄化合物の中でも、特に抗酸化活性を有する低分子量チオール化合物は生命活動において重要な役割を果たしている。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチドで、ヒトを含む広範囲の生物に見出される主要な低分子量チオール化合物であり、細胞の酸化還元バランスの維持等に利用されている。一方、土壌から見出される放線菌の多くはグルタチオンを産生せず、その代替物としてマイコチオールとエルゴチオネインを生合成する。マイコチオールはアミノ基がアセチル化されたシステインを部分構造にもつものに対し、エルゴチオネインには明白なシステイン構造は認められないが、システインの硫黄原子が利用されていることは知られていた。マイコチオール生合成経路はその生合成遺伝子破壊株を用いて解析され、その全容が明らかにされていた。一方、エルゴチオネイン生合成経路の詳細は長らく不明であったが、2010年に *Mycobacterium smegmatis* より5遺伝子から成るエルゴチオネイン生合成遺伝子クラスターが取得・解析され、その全容が解明された。そこで我々は放線菌 *Streptomyces coelicolor* のマイコチオールおよびエルゴチオネイン生合成遺伝子破壊株を構築し、それらの各種酸化剤に対する感受性評価を行った。その結果、本株においてエルゴチオネインが酸化ストレスに対してより重要な働きを持つと示唆された。エルゴチオネインはヒトをはじめ多くの生物に存在する。ヒトはその生合成経路をもたないが、エルゴチオネイン特異的トランスポーター (OCTN1) で積極的に取込むことから、生命維持において重要な化合物と考えられている。現在、化粧品やサプリメント用にキノコ抽出物が利用されているが含有量は低く、新たな供給法が望まれている。このような背景から、エルゴチオネインの発酵生産について検討しているので、その成果についても紹介する。

植物は成長に伴ってペクチンに由来するメタノールを放出しており、その量は年間1億トンに達する。そのメタノールを利用できるMethylobacterium属細菌は植物葉面の微生物群集で優占化しており、10-20%を占める。本属細菌は植物への接種によりその成長を促進する。私たちは屋上緑化に用いられるエゾスナゴケの生育促進細菌を探索する中で本属細菌を分離し、植物・微生物相互作用のモデルとして研究対象としている。本属細菌のCE-TOF/MSによるメタボローム解析により、細胞内にエルゴチオネインが高蓄積していることを見いだした。エルゴチオネインはヒスチジンから生合成される含硫アミノ酸の一つであり、高い抗酸化活性を持っているが、非常に高価であり、安価な製造法の確立が求められている。またヒトの血液にも存在し、各種の疾病にも関わっていると考えられている。エルゴチオネインは限られた微生物のみが合成すると考えられてきたが、生合成経路がMycobacterium属細菌において明らかになったことから、様々な微生物にその生産性があることが示唆されている。本属細菌によるエルゴチオネインの高生産性は新規に発見されたことであり、メタノールという安価な炭素源を用いた発酵生産方法の確立が期待される。本シンポジウムでは、本属細菌を用いたエルゴチオネインの発酵生産に向けた取り組みと、本属細菌における役割、また他の細菌・酵母等におけるエルゴチオネイン生産性の分布などを紹介する。

大津 厳生 (筑波大学高細精医療イノベーション研究コア, 株式会社サルファーインデックス)

これまでに微生物の硫黄同化の研究に取り組み、システイン、メチオニンをはじめERGを含む硫黄代謝物種の分離・定量解析法を構築した。本解析は、チオール基のモノプロモビマンによる修飾法と高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS/MS) 法の利点を組み合わせた方法で、数十n- μ Mの検出感度を有し、20分で50種の硫黄関連代謝物種の網羅的な一斉解析が可能である。この得られた定量結果を私達は「サルファーインデックス」と呼んでいる。このサルファーインデックスを用いた主成分解析により、サンプルは高精度にクラスタリングでき、多くのサンプルが、「酸化還元度 (鮮度)」に関与する因子 (第1主成分)、「抗酸化能 (微生物の働き)」に関与する因子 (第2主成分) の含有量で特徴づけられることが分かった。多変量解析のみから、サンプル間の違いを表す指標を明確に示すことは難しい場合も多いが、私たちは、解析する物質を最適化することで、鮮度や微生物の働きといった生物機能の尺度での評価を可能にした (特願2017-094037)。

微生物や植物には土壌中の無機性硫黄化合物を取り込み有機性硫黄化合物に固定する硫黄同化系が存在する。一方、ヒトなどの哺乳類に硫黄同化経路は存在しない。そのため哺乳類は生命活動に必須な硫黄源を食事から摂取している。従って、有機硫黄物質を多く含む作物は、ヒトを含む動物にとって重要である。さらに、有機硫黄物質で、システイン、シスチン、グルタチオン、エルゴチオネイン (ERG) は、優れた抗酸化能を有するため、これらは作物への蓄積による機能性付与の候補となる。特に、ERGは、ビタミンE・Cより優れた「生体過酸化物の消去機能」による抗老化・抗癌作用などが認められ、健康促進に非常に重要であることが近年報告されている。それ故、ERG高含有作物は、「食事を通してより良い健康」といった消費者ニーズに応えられる機能性作物となり得る。

私達はこれまでにERG生産大腸菌を構築しており、このERG生産菌を含む水耕液で野沢菜、小松菜、水菜を栽培し、作物にERGを吸収・蓄積させることに成功した (特願2017-27866)。本シンポジウムでは、最初に硫黄のメタボローム解析と主成分解析を組み合わせることで、2つの成分で「見える化」できる新しい評価系についてご紹介し、生物間移行できるERGを指標とした評価系の用途についても議論したい。

A-001

ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム(HFSP)の紹介

古川 修平 (日本医療研究開発機構 / AMED)

ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム(HFSP)は生体の精妙かつ複雑なメカニズムに焦点を当てた革新的、学際的、かつ新規性を備えた基礎研究を支援する国際グラントです。研究対象は、分子や細胞レベルにおける生物機能から、高次の神経基盤における複雑な生物システム、さらには生態系における生物相互作用にまで及びます。特に、ライフサイエンス以外の分野（物理学、数学、化学、情報科学、工学等）の科学者達の専門知識を活用した、独創的な最先端の共同研究に大きな重点を置いています。まず始めにグラントの特長や概要について簡単に説明を行います。

A-002

HFSPグラントの審査過程とポイント

金城 政孝 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院)

HFSPが重視する3つの「I」があり、innovative, interdisciplinary and international (preferably intercontinental)と示されています。HFSPのinnovative（革新性）とはどのようなものなのか、また、それがグラント審査にどのように評価されているのかなどを審査員を経験した立場から解説したいと思います。そして、多くの研究者や若手の研究者がそれぞれの立場で申請することを希望しています。

A-003

制限酵素修飾系の進化に関するHFSP国際共同研究を終えての所感

若本 祐一 (東京大・院総合文化, 東京大・複雑系センター)

我々は、2011年度のHFSP若手研究者グラントに採択され、制限酵素修飾系の進化に関する国際共同研究を行った。ニューヨーク大学のEdo Kussell氏 (PI)、IST AustriaのCalin Guet氏、そして東京大学の若本でチームを組みプロジェクトを遂行した。我々のグラント期間は既に終了しており、HFSPは過去の良き思い出といった感もあるが、未だにチームメンバー間での共同研究は続いており、良い影響が残っている。一方、今から考えるとプロジェクトの進め方について反省する点も多い。今回のシンポジウムでは、我々がHFSPの申請テーマをどのように設定し、実際にどのように研究を行ったかについて、研究結果も踏まえながら具体的事例として紹介したい。また、グラント期間をしばらく前に終えて、当事者感が減じた今になって思う、HFSPグラントに対する個人的感想・評価についても述べたい。

A-004

How to prepare HFSP grant proposal

宮崎 亮 (産総研・生物プロセス)

HFSPは世界的に最も有名な国際研究グラントの一つで、欧米の第一線の研究者で本グラントを知らない人はいない。生命の本質に迫る挑戦的かつ革新的な研究を手厚く支援する本グラントは非常に競争率が高く、選ばれる課題も先進性が高いことから、世界的には「最終選考に残るだけでも業績になる」と言われる。本シンポジウムでは、HFSPの魅力のみならず、応募の動機から申請書作成のコツまで自身の採択例をもとに紹介する。特に、国内研究費の申請とは大きく異なるポイントを中心に取り上げ、将来申請を考えている方々にとって有益な情報を提供できれば幸いである。