

久能 均^{1,2}, 久能 樹^{1,2}, 高田 潤^{1,2}¹岡山大学大学院自然科学研究科, ²JST-CREST

*Leptothrix*属は、湧出地下水が流れる泉、小川や側溝などに生息する一般的な鉄酸化細菌で、水面に漂う黄褐色鉄さび状のバイオフィルムを形成する特性をもつ。バイオフィルムは直径約1~2 μm の無数の鞘構造（以下、鞘）の集塊である。本菌細胞は表面から有機ナノ繊維（直径数 nm）を分泌しながら長軸方向に分裂し連鎖状になる。分泌ナノ繊維は相互に癒着し直径20~30 nmの繊維束となり、織り重なって細胞連鎖の外側に鞘原基を形成する。鞘原基を構成する有機物の活性基が水中の無機元素を引き付けることによって鞘原基に無機元素が吸着し、成熟した有機・無機ハイブリッド鞘となる。無機元素の中でFeの吸着が最も顕著で、主にFe oxyhydroxide（一種の酸化鉄）を形成するため鞘は黄褐色を呈する。ハイブリッド中では、Fe、Si、Pが-OHなどを介して相互結合し、人工的には合成困難な複雑な複合体を形成する。有機成分の活性基とは別に、この複合体の構造自体が水中の無機元素をさらに吸着する役割を果たすと考えられる。成熟した鞘は内層と外層から成っており、内層は鞘原基そのもので、その外表面から外側に向かって無数に伸張する分泌ナノ繊維が外層を形成する。化学固定した鞘をSEMで観察すると、鞘内層は突起状、外層は網目状に見える。外層はナノ繊維が折り重なり全体として間隙の多い構造となっているために、無機元素の吸着性を高める要因と成っている。ナノ繊維はアミノ糖を含む多糖質、タンパク質、脂質、核酸などからなっており、これらが有する-COOH、-OH、-NH₂、-SH、S=Sなどの活性基が無機元素との相互作用に役割を果たすとされている。反応性が高い鞘の構造・理化学的特性を基盤として、我々は新規産業的素材の開発を続けており、特に、リチウム電池の陰極素材、顔料、触媒促進剤、細胞培養資材、含鉄殺菌剤開発への展開を目指している。

片岡 剛文¹, 田仲 あいら¹, 前川 鈴香¹, 中野 伸一², 近藤 竜二¹¹福井県大・海洋生物資源, ²京大・生態研

地球上のあらゆる環境には微生物が存在し、微生物ループを介した物質循環が生態系の維持に重要であることが明らかとなりつつある。海洋や湖沼といった水圏は微生物の分散が活発である上に利用可能な有機物が存在するため、細菌群集が有機物の循環に大きく貢献していることが知られている。特に堆積物は水柱環境から沈降する有機物が蓄積されるため、一次生産の場である有光層と共に細菌の生物量が多く、微生物による物質循環が活発な環境であると考えられる。しかし、好氣的な水柱環境と比べて嫌氣的な堆積物環境における微生物ループに関する知見は極めて少ない。また、一般的には、鞭毛虫、繊毛虫、アメーバを始めとする原生生物が細菌を摂餌し、原生生物は動物プランクトンに摂餌される過程を経て、有機物が生食物連鎖へと再循環すると考えられているが、形態や生活史が複雑な原生生物の組成を把握するのは難しく、どのような種類の原生生物がこの過程に関与しているかは明らかではない。そこで本研究では、嫌氣的な水圏環境における堆積物中の原生生物の組成を明らかにすることを目的とした。塩分濃度の異なる3つの湖沼（琵琶湖（淡水）・日向湖（塩水）・水月湖（汽水））で嫌気層が発達する時期の堆積物を各2回採集し、合計6試料中の原生生物に共通の18S rDNA部分領域をPCRで増幅し、次世代シーケンス法（MiSeq, illumina）を用いて網羅的に比較解析した。92%の相同性を基準に作成した操作上分類単位（OTU）の内、18S rDNAと同定されたOTUの数は4,802あった。各試料のOTU数をRarefaction curveで推定したところ、十分数の塩基配列を分析できていた。OTU数は琵琶湖、日向湖、水月湖の順に多く琵琶湖の原生生物群集組成が多様であると推定された。また、クラスター解析ではOTU組成は湖毎に類似しており、原生生物の群集組成は湖毎に異なり、経時的な変化は小さいことが示唆された。SIMPER解析により湖に特徴的なOTUを選出し高次分類群レベルで比較したところ、琵琶湖ではCiliophora、日向湖では未同定のAlveolata、水月湖ではProtalveolataに属するOTUが多様かつ優占していた。本研究により嫌氣的な堆積物環境に多様な原生生物が存在し、湖沼によりその組成が異なることが明らかとなった。

山口 晴代¹, 片岡 剛文², 中川 恵¹, 河地 正伸¹¹国立環境研究所, ²福井県大・海洋生物資源

霞ヶ浦は日本で二番目に大きな面積を持つ湖で、水資源、漁業資源、水質浄化やレクリエーションの場など、さまざまな機能を担っている。国立環境研究所では毎月、植物プランクトンおよび従属栄養性プロティスト密度をモニタリングしており、霞ヶ浦の主要な一次生産者はシアノバクテリアと珪藻類であることが分かっている。モニタリングでは顕微鏡を用いてその同定がなされており、藻類の多くは属レベルでの同定が可能である一方で、従属栄養性プロティストは同定が難しく、これまでその細胞密度のみしか計測できていなかった。そこで、本研究では、霞ヶ浦におけるプロティスト全体の組成を詳細に把握し、その群集構造変化を経時的に明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた18S rRNA遺伝子によるアンプリコン解析を行った。国立環境研究所が行っている月一回の定期モニタリングにおいて、2012年6月から2015年5月（36ヶ月）にかけて表層水を採水し、フィルター試料からDNAを抽出した。18S rRNA遺伝子を真核生物ユニバーサルなプライマーを用いてPCR増幅し、次世代シーケンサーを用いて配列取得をした。結果、OTU数では年間を通してストラメノパイルおよびアルベオラータに属するプロティスタが多く、存在比では年間を通してストラメノパイル、アルベオラータ、オピストコンタ、クリプト藻が優占していることがわかった。NMDS解析の結果、年が変わっても同じ月のプロティスタ組成が類似し、明瞭な季節変化を示すことがわかった。また、その組成は6-11月、12-5月の2つのグループに分けられた。また、珪藻類やクリプト藻のOTUが年間を通して多様であることも明らかになった。

前川 鈴香¹, 片岡 剛文¹, 高尾 祥丈¹, 中野 伸一², 近藤 竜二¹¹福井県大・海洋生物資源, ²京大・生態研

溶存態有機物を細菌が栄養基質として利用して増殖し、その細菌を原生生物が摂食し、さらに原生生物を動物プランクトンが捕食するという一連の経路を微生物ループと呼び、水圏の生態系、特に浮遊生態系における重要な経路である。原生生物はこの系を駆動する役割を担っており、中でも従属栄養性微小鞭毛虫（HNF）や繊毛虫が主要な細菌摂食者である。一方、底泥に関しては、嫌気的な環境であるものの、多様な原核微生物が存在し、その現存量は水柱に比べて極めて高いことが知られている。しかしながら、このような嫌気的な底泥中での原生生物の生態に関する知見は殆どない。本研究では、水圏の嫌気環境における原生生物の生態を解明する一助として、琵琶湖南湖を対象に、底泥中のHNFの現存量を明らかにするとともに、嫌気性原生生物の種ごとの生理学的特徴からその生態を推測するために、その単離株の作成を試みた。琵琶湖南湖の浚渫地の底泥表層（0-5 cm）を採取し、現場で、グルタルアルデヒドで固定した。実験室にて、密度勾配遠心法によりHNFを回収し、孔径0.8 μmのフィルター上にろ過捕集した後、プリムリンで細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察・計数し現存量を求めた。また、底泥を嫌気培地に添加して20°C、暗所で培養し、原生生物の増殖が認められた培養液からキャピラリーアイソレーション法と段階希釈法を併用して単離株を得た。底泥中のHNFの現存量は、 $3.0\sim6.7\times10^4$ cells/mLで、底泥上1 mの水中の67~148倍高く、嫌気的な環境でも底泥にはHNF数が多いことが明らかとなった。底泥から、2株のHNFと1種類の繊毛虫を含む集積培養が得られた。このうち1株のHNFは、通性嫌気性で、嫌気条件では鞭毛虫様細胞の形態となるが、好気条件ではアメーバ状の形態を示した。この株の18S rDNAの塩基配列を決定したところ、*Mastigamoeba abducta*と99%の相同性を示した。もう1株のHNFは偏性嫌気性で、18S rDNAの塩基配列から*Ditrichomonas honigbergi*が最も近縁であったが、その相同性は96%でしかなかった。繊毛虫は*Trimyema compressum*と97%の相同性を示した。この種は内部共生メタン生成菌を持つことが知られており、本研究で得られた繊毛虫もDAPI染色により内部共生菌の存在が確認された。このような共生菌を有する原生生物は、細菌摂食者としての機能だけでなく、メタンの生成・放出など物質循環過程に関与している可能性が示唆された。

久保 豊子¹, 東岡 由里子²¹鶴岡高専・創造工学科, ²高知高専・ソーシャルデザイン工学科

河口域は流れが緩やかなため有機物が堆積しやすく、好気分解が進むと堆積物中の酸素はすぐに枯渇する。このような嫌気環境では硫酸還元菌等によって活発な有機物分解が行われており、河川から海洋への有機物の直接放出が抑えられていると予想される。本研究では環境条件の異なる物部川（高知県）と赤川（山形県）の河口堆積物を用いて、主要な汚染物質である炭化水素の嫌気分解に関わる新規微生物の集積培養の確立を目指した。堆積物を採集し、1.トルエン、2.エチルベンゼン、3.シクロヘキサン、4.安息香酸を基質として培養を行った。赤川河口堆積物を用いた培養では、汽水Widdel培地を用いて培養したところ、微弱的な微生物の増殖と硫酸還元による硫化水素の発生が見られた。また物部川河口堆積物では、乳酸を基質として加えた培養系では増殖が確認されたが、硫酸還元による硫化水素の発生は確認されなかった。原因としては両河口の堆積物の粒径が大きく（1-2 mmの砂状）、元々付着していた硫酸還元菌の数が少なかった可能性がある。一方比較調査のために用いた鳥海山の原油汚染土壌を接種源とした培養では、上記の4種類の基質を用いた培養系のすべてで硫化水素の発生がみられた。菌数は少ないものの、微生物による硫酸還元が起きていると考えられる。また、鏡川（高知県）の河口堆積物を採取し、硫酸還元条件下で上記基質を用いた培養を行った。試料採取場所は潮汐によって海水が逆流する感潮域であるため、海水培地を用いて培養を行った。その結果、トルエンあるいは安息香酸を基質とした2つの培養系で微生物の増殖が確認された。培養系内からは硫酸還元の生成物である硫化物が検出された。鏡川河口堆積物は粒径が小さいことから、赤川や物部川河口堆積物と比較して硫酸還元菌が多く付着している可能性がある。今後、増殖の認められた培養系内の微生物群集構造の解析を行い、新規性の高い硫酸還元菌の塩基配列情報が得られた場合は、上記の基質も用いて分離を目指す。

包 智華, 曹 偉偉, 劉 菊梅, 趙 吉
内蒙古大・生態環境院

湿原はメタン発生の主な発生源となっており、主に植物根を通して大気中に放出するとされているが、その過程で16-90%のメタンが根に棲息するメタン酸化細菌によって酸化されると言われている。近年、イネ根を対照にした種々の研究では、イネ根においてメタン酸化細菌が棲息し、イネ根の表面と中心部のType IIのメタン酸化細菌が窒素固定していることが示唆されている。しかも、イネ根からType IIのメタン酸化細菌も分離されているが、湿原植物の一つであるヨシ根からのメタン酸化細菌の分離等の報告が殆どない。内蒙古は中国北の方で湿原面積も大きく、ヨシは優勢植物として知られている。本研究では、集積法を用いて中国内蒙古の湿原における直物ヨシ根からメタン酸化細菌を分離し、さらにCARD-FISHでその組織局在性を調べた。その結果、まず、メタン酸化細菌の最初の集積培養体を次世代シーケンサーで解析し、Type IIメタン酸化細菌Methylocystis sp.

(相対豊富さ, 60.5%) と共同体として非メタン酸化細菌属のMethylobacterium sp. (10.4%)とRhizobium sp. (8.8%)が同時に優勢菌として検出された。恐らく、集積培養でメタン酸化細菌とメタノール酸化性細菌の共同体であったと思われる。そして、限希釈法でヨシ根から4株のType IIメタン酸化細菌を分離した。そのうち、PRM1、PRM3とPRM4菌株はMethylobacterium sporium NCIMB 11126と98-99%の16S rRNA相当性を示し、PRM1はMethylocystis rosea SV97と99%の相同性であった。さらに、ヨシ根におけるType IIメタン酸化細菌の組織局在性を調べるため、Type IIメタン酸化細菌の4菌株のCARD-FISHでシグナルがはっきり確認した後、ヨシ根のCARD-FISHを行った。その結果、根の表面と中心部からメタン酸化細菌のシグナルが検出された。以上の結果からType IIメタン酸化細菌がヨシ根の表面と中心部に棲息していることが示唆された。この結果は水稻根のType IIメタン酸化細菌の局在性とよく類似している。

石田 真由¹, 藤本 尚志², 大西 章博², 蔣 紅与², 渡辺 智³, 兼崎 友⁴, 石毛 太郎⁴

¹東京農大院・農学, ²東京農大・応生, ³東京農大・生命, ⁴東京農大・生物資源ゲノム解析センター

次世代シーケンサーの普及により水界生態系の微生物群集構造を詳細に解析できるようになってきた。そこで本研究では貧栄養ダム湖の窒素循環の微生物学的メカニズムを解明することを目的として神奈川県宮ヶ瀬湖の表層水、中層水(水深約40m)、底層水(約80m)について真正細菌、古細菌をターゲットとした16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングを行った。中層と底層に共通してThaumarchaeota門のMarine Group Iに分類されるアンモニア酸化古細菌の*Candidatus Nitrosoarchaeum*に近縁な複数のOTU (Operational Taxonomic Unit)が検出された。2016年4月から9月において、総リード数に占める割合は中層で1.4~8.9%、底層で1.5~8.7%であった。中層と底層の*Candidatus Nitrosoarchaeum*に近縁なOTUのリード数を比較してみると、4,5月は底層で多く、6月は同程度、7,8月は中層で多く、9月は再び底層で多くなり、時期によって鉛直分布が異なることが明らかとなった。アンモニア酸化細菌である*Nitrosospira*属に近縁なOTUのリード数の割合は最大で0.2%程度であり、アンモニア酸化古細菌が宮ヶ瀬湖のアンモニア酸化反応において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

中嶋 泰介, 春日 郁朗, 栗栖 太, 古米 弘明
東大院・工

細菌が溶存有機物を利用することが起点となる炭素フロー「微生物ループ」は、水圏における有機物組成に影響する重要な要因である。特に細菌の代謝産物やバイオマス由来の成分は、難分解性有機物の起源の一つと考えられる。しかし、どのような細菌が溶存有機物の質的形成に関与しているのかは不明な点が多い。そこで本研究では、近年、難分解性有機物の蓄積が報告されている琵琶湖を対象として、微生物ループに大きく寄与する細菌群を特定し、それらの細菌群が増殖に伴ってどのような溶存有機物を産生し、湖水中の溶存有機物組成に影響を与えているのかを評価した。2016年10月に琵琶湖近江舞子浜沖の表層水を採水し、別途ろ過及び熱処理によって無菌とした湖水を用いて全菌数が1/10となるように希釈し、暗所培養した。培養前後の細菌群集構造をアンプリコンシーケンシングで解析し、培養後に優占度が増加した細菌群をスクリーニングした。また、R2A培地を用いてそれらの細菌群の単離を試みた。無機培地にグルコースと酢酸を5 mgC/Lずつ添加した液体培地中で単離株を培養し、培養後に残存する溶存有機物の組成をOrbitrap質量分析計で解析し、琵琶湖湖水中の溶存有機物の組成と比較した。湖水の培養前後の細菌群集構造を解析すると、Limnohabitans属に近縁なOTUの割合が最も増加していた。このOTUに近縁な単離株（B1株）を獲得し、グルコースと酢酸を有機物源として培養した。その結果、培養2日後にはB1株の全菌数が 4.1×10^7 cells/mLまで増加すると共に、溶存有機炭素濃度が12.2 mgC/Lから2.9 mgC/Lに減少した。その後5日後まで、全菌数、溶存有機炭素濃度ともに大きな変化はなかった。B1株の培養試料から溶存有機物を固相抽出し、Orbitrap質量分析計によって解析した結果、B1株由来の溶存有機物として347分子の分子式が推定された。一方、湖水から抽出した溶存有機物をOrbitrap質量分析計で解析した結果、618分子の分子式が推定された。B1株由来と湖水の溶存有機物を分子式レベルで照合したところ、合計280分子が一致していた。このことから、増殖活性が高いLimnohabitans属に近縁な細菌に由来する溶存有機物が、湖水中の溶存有機物の起源の一つになっていることが示唆された。

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

¹日大 生資, ²北大 低温研

目的：北海道厚岸湖アマモ群落内の砂泥は、亜酸化窒素の発生を抑制することが明らかになってきた。しかし、北海道厚岸湖アマモ群落内の泥で亜酸化窒素発生の軽減に関与している微生物については未解明である。脱窒素菌は亜酸化窒素を窒素ガスに還元できる。一方、アンモニア酸化菌は亜酸化窒素を発生する。本研究では、アマモ群落または非アマモ群落の砂泥からの亜酸化窒素発生と脱窒素菌量およびアンモニア酸化菌量の変化を調べ、北海道厚岸湖アマモ群落内の砂泥による亜酸化窒素発生抑制と脱窒素菌分布の関係を明らかにすることを目的とした。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砂泥をコアサンプラーで採取した。表層0 cmから4 cmを均一に混ぜた砂泥と過滅菌済の海水を血清ビンに添加し、10日間20℃暗所で培養を行った。アマモ群落と非アマモ群落の砂泥に対して次の3つの実験区を設定した。実験区1) 塩化アンモニウム無添加、実験区2) 塩化アンモニウム1 mM添加、実験区3) 0.34 mL 100%亜酸化窒素添加。培養後の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。培養前の砂泥と培養後の砂泥から核酸を抽出し、亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (nosZ - cladeII) およびアンモニア酸化酵素遺伝子 (amoA - archaeaあるいはbetaproteobacteria) を標的としたリアルタイムPCR解析およびクローン解析 (nosZ - cladeII及びII) による群集構造解析を行った。結果と考察：実験区1と2ではアマモ群落の亜酸化窒素濃度は、非アマモ群落のそれよりも低かった。nosZ (cladeII)遺伝子の増加量は実験区1と2ともにアマモ群落の方が大きかった。逆に、亜酸化窒素濃度が増加した非アマモ群落ではアンモニア酸化アーキアのamoA遺伝子の増加量が大きかった。実験区3の亜酸化窒素濃度は、非アマモ群落よりもアマモ群落の方が低くなり、nosZ (cladeII)遺伝子はアマモ群落の方が非アマモ群落より2倍多かった。逆にアンモニア酸化アーキアのamoA遺伝子量は非アマモ群落よりアマモ群落の方が3倍多かった。アンモニア酸化バクテリアのamoA遺伝子量は全ての実験区で培養後に減少した。以上の結果より、アマモ群落内の砂泥の亜酸化窒素発生抑制の原因は、アマモ群落の砂泥では脱窒素菌が活性化され、アンモニア酸化アーキアによる亜酸化窒素発生量が少ないことが原因であると推定された。

野中 里佐¹, 杉本 侑大², 小林 剛³, 丸山 史人⁵, 竹村 太地郎⁴, 関 泰介¹, 天田 圭太¹, 鈴木 聡², 増田 道明¹

¹獨医大・医, ²愛媛大・沿岸セ, ³愛媛大・医, ⁴長崎大・熱帯医, ⁵京都大・環境微生物

水環境に生息する微生物に起因する感染症の一つにコレラがある。日本で近年報告されるのは輸入症例のみであり、国内の自然環境における *V. cholerae* の分布情報は極めて限られている。本研究では日本における *V. cholerae* の分布状況を調べ、得られた環境分離株と諸外国における分離株（臨床・環境由来）との系統関係を明らかにすることを目的とした。2016年3月から11月に7回、瀬戸内海沿岸10地点（重信川河口域を含む）で環境水を採取した。得られた試料にアルカリペプトン水を加え（最終濃度1%）、室温で持ち帰った後、37°Cで17-18時間静置培養した。培養液の一部からDNAを抽出しPCRによる *toxR* 遺伝子の検出を行い、陽性試料をTCBS寒天培地上に塗布後培養した。白糖分解能を示す黄色コロニーについて16S rRNA遺伝子配列を決定し *V. cholerae* と確定した。それぞれの分離株について、血清型遺伝子（O1-*rfb*、O139-*rfb*）および毒素遺伝子 *ctxA* の有無をPCRにより調べた。さらにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）によるゲノタイピングおよびHiSeqを用いた全ゲノム配列決定を行った。水温が20°C以上の6月から9月には10地点中8地点以上からまた5月および11月には各1地点から *V. cholerae* が分離され、松山市沿岸域および重信川河口域には本菌が常在していると考えられた。また分離頻度は地点によって異なり、対象とした10地点は高頻度分離地点、中頻度地点および低頻度分離地点に分類できた。分離株からはO1-*rfb*、O139-*rfb*および *ctxA* は検出されず、コレラの原因とはならないnon-O1/non-O139タイプ（ナグビブリオ、食中毒原因菌）であると推定された。PFGEによるゲノタイピングはHiSeqによるゲノム解析結果と合致し、調査地域には繰り返し分離されるゲノタイプが少なくとも4つ存在することが明らかになった。現在、ゲノム配列データを用いて海外分離株との系統関係を解析中である。

伊藤 真奈¹, 梅澤 明夫², 川市 智史², 庄野 暢晃², 中村 龍平², 伊藤 克敏¹¹水産機構・瀬水研, ²理研・環境資源科研究セ

【目的】海洋底質には、多種多様な微生物と底生動物が生息し、相互に作用することによって複合生態系を形成している。我々はこれまで、貧酸素、重汚染底質に耐性を有する海産ミミズ（*Thalassodrilides cf. biani*）を還元的底質へ添加することで、底質の酸化還元電位（環境電位）が上昇することを確認している。環境電位は、海洋底質の様々なパラメータを包括的に表現しており、養殖場下など有機汚濁が深刻な問題となっている底質の汚染対策に非常に有効な評価基準である。環境電位を用いた底質の健全性モニタリングの確立には、環境電位、微生物群集、底生動物の複合的な相互関係を明らかにすることが求められる。しかしながら、海産ミミズによる底質の微生物群集の変化やミミズの体内外に付随する微生物に関する知見は皆無に等しい。

【方法】本研究では、高感度かつ長期間安定的に環境電位を測定できるガラス電極（F-doped Tin Oxide, FTO電極）を使用した電気化学リアクターを用い環境電位の測定をリアルタイムで実施した。具体的には電気化学リアクター内に、大阪湾より採取した還元的底質2gと海産ミミズを入れ、一定期間培養を行った。環境電位の挙動に合わせて、底質および海産ミミズを回収し、16SrRNA遺伝子を対象として、Illumina Miseqシステムによる次世代シーケンス解析を実施した。【結果・考察】海産ミミズを還元底質に添加した直後は環境電位は約-300mVであったが、海産ミミズを加えた試験区のみ徐々に電位が上昇し、約2週間後-30mVまで電位が上昇した。海産ミミズの添加および電位の変化に伴い、底質の微生物群集は、Gammaproteobacteriaに属する微生物群の組成が変化した。特に、電位の上昇時にChromatialesに属する菌が増加した。ミミズに付随する微生物群集の多様性は、底質に比べ有意に低かった。また一方で、その微生物群集構造は、生息底質の菌叢に大きく依存し、還元的底質への添加直後は、添加された底質の菌叢に近づくものの、飼育に伴いVerrucomicrobiaに属する細菌群の割合が顕著に高まるなど、独自の菌叢を形成することが示唆された。

栗原 尚輝¹, 稲垣 翔太², 小山 悠太², 山梨 由布¹, 伊藤 司¹¹群馬大・院理工, ²群馬大・理工

河川水と海水が交わる汽水域では、豊富な栄養塩により多様な生物が育まれている。我々はその栄養供給源の一つに細菌の溶菌現象があり、汽水域での急激な塩濃度変化により引き起こされていると考えている。また、汽水域の溶菌現象が下水処理場等からの放流水に含まれる大腸菌群数を減少させる衛生的役割を担う可能性が考えられる。本研究では茨城県を流れる那珂川を対象とした。那珂川河口の汽水域の計8か所で得た汽水サンプル中の細菌をR2A培地により分離培養し16SrRNA遺伝子系統解析を行った。一方、採水サンプルを濾過によりフィルター上に集菌し、次世代シーケンサー解析を行い汽水域の細菌群集構造を明らかにした。汽水域における優占種であったAlphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Actinobacteria、Bacilli、Flavobacteriaとデゾキシコレート培地により分離した大腸菌群に対して、汽水域を想定した塩濃度変化に対する溶菌特性を調べた。Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Flavobacteriaの多くが塩濃度0%から3%への変化により溶菌が促進された。それに対し、Actinobacteria、Bacilli、Gammaproteobacteriaでは塩濃度0%から3%への変化に加え、塩濃度3%から0%への変化でも溶菌が促進された。また大腸菌群では塩濃度0%から3%への変化により溶菌が促進された。この結果は、河川に放出された大腸菌群が海水に触れるような急激な塩濃度変化を受けることで溶菌し、大腸菌群数が減少することを示唆している。そして溶菌前後の溶解性窒素・リンの測定結果からは、溶菌によって汽水域に供給される栄養塩量を推定することができた。以上から本研究では、汽水域の細菌群集系統ごとに溶菌特性を有する可能性があり、溶菌現象が汽水域の栄養供給源になっていることが考えられた。さらに溶菌現象は汽水域において大腸菌群数を減少させることから、生態学的にも衛生的にも重要な役割を担っているといえる。

永田 恵里奈¹, 若井 稜¹, 松岡 真史¹, 中瀬 玄德², 江口 充¹
¹近畿大・農, ²近大水研

養殖漁場では養殖魚の餌の食べ残しや糞などが海底に堆積する。これらの有機物は、自然環境の浄化能力、すなわち水柱や底泥に存在する微生物（主に細菌）により、ある程度は分解・無機化される。しかし、夏季の高水温時には海水の鉛直混合が十分に行われず、水塊が成層化し、表層から底層への酸素の供給が不十分になる。この時期に海底に達する有機物量が多くなると、微生物による分解・無機化による酸素消費量が増え、海底は貧酸素状態になる。すると、底泥中の乳酸などの有機酸濃度が上がり始め、硫酸還元細菌がこれを還元剤として利用し硫化水素を生成する。魚介類の生産性が低下する自家汚染（漁場老化）の始まりである。漁場老化の程度を評価するために、従来は底泥に蓄積した硫化物量や硫酸還元細菌数が用いられていた。しかし、これらの指標は、すでに養殖漁場の環境が悪化してしまった『結果』を調べているにすぎない。悪化を予防するためには、悪化が起きる予兆を知る指標の方が役にたつ。底泥の硫酸塩還元活性は硫酸還元細菌の現存量ではなく、有機酸（主に乳酸）濃度に依存し、有機酸量が硫化水素の生成に強く関わっていることが知られている。従って、底泥で乳酸の蓄積に貢献していると考えられる生理活性の高い乳酸菌数を指標とすれば悪化の進行を事前に察知できるのではないかと考えた。そこで、本研究では、養殖漁場の底泥に「漁場老化を早期発見する指標細菌」になりそうな乳酸菌がいるかどうかを調べた。和歌山県田辺湾の養殖漁場内の養殖生簀が多く存在する養殖域と養殖生簀が設置されていない非養殖域の海底泥から乳酸菌の分離を試みた。その結果、乳酸菌が分離できたのは夏季であり、それ以外の時期は乳酸菌を分離することができなかった。さらに、非養殖域よりも養殖域の方が多く乳酸菌を分離することができた。細菌種の同定を行ったところ、14種類の乳酸菌から構成されており、そのうち2種類の乳酸菌は養殖生簀の下から高頻度で分離された。これらの2種類の乳酸菌は、養殖活動の影響を強く受けていることが示唆された。

北村 徳一¹, 池尾 一穂¹, 石野 良純², 田代 康介², 久原 哲², 尾田 成幸³, 依積田 貴彦⁴, 吉村 直晃⁵, 多治見 誠亮⁵, 堀田 敏弘⁶, 中村 洋路⁷, 安池 元重⁷, 藤原 篤志⁷, 長井 敏⁷, 小林 敬典⁸, 五條堀 孝^{1, 9}
¹遺伝研, ²九大院・農, ³福岡農林水産部, ⁴福岡水海技セ豊前海研究所, ⁵熊本水研セ, ⁶高知水試, ⁷水産機構中央水研, ⁸水産機構本部, ⁹KAUST(アブドラ国王科学技術大)

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、シャットネラブルーム発生時の細菌群集動態における地域性の影響を明らかにすることを目的として、ブルーム発生時と非発生時の海水を複数地点から採集し、微生物DNAを抽出し、分類群及び遺伝子機能の相対量を調べた。2012–2015年夏季の豊前海、2012–2013年夏季の有明海、2015年夏季の浦ノ内湾の3地域からシャットネラブルームを含むサンプルを得た。これらの採水サンプルは8、1、0.2 μ m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 μ m 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。地域ごとにブルーム発生サンプルと非発生サンプルの間で分類群及び遺伝子機能の相対量比較を行い、各地域のブルームに特徴的な分類群及び遺伝子機能の抽出を行った。豊前海と浦ノ内湾では、ブルーム発生時に相対量が増加する主要な分類群としてRhodobacterales、減少する主要な分類群としてPelagibacteralesが挙げられた。一方、有明海では、ブルーム発生時に相対量が減少する主要な分類群としてCellvibrionalesが挙げられた。遺伝子機能に関しては、豊前海と浦ノ内湾においてブルーム発生時に相対量が増加する共通の遺伝子機能として、炭水化物の輸送と代謝が挙げられた。各地域で抽出された分類群や遺伝子機能には、1地域のみで抽出されたものもあり、地域により細菌群集動態が異なることが示唆された。シャットネラブルーム時の細菌群集動態に与える地域性の影響について議論する。

鈴木 重勝¹, 片岡 剛文², 渡辺 剛³, 桑田 晃³, 山口 晴代¹, 河地 正伸¹¹国立環境研, ²福井県立大・海洋生物資源, ³東北水研

珪藻は、海洋の主要な一次生産者であり、水塊混合による栄養塩供給が豊富な沿岸域や湧昇域で大増殖しブルームを形成する。珪藻は海洋全体の約40%の炭素固定を担い、表層の炭素を深層へ輸送する海洋生態系の物質循環に大きな影響を及ぼしている。この物質循環においてブルームの形成は重要な役割を担っている。しかし、ブルーム形成期の珪藻の細胞応答に関する知見は少ない。本研究では、大規模な珪藻ブルームが恒常的に発生する春季の北太平洋亜寒帯親潮域をフィールドに、当海域で主要なブルーム形成種 *Thalassiosira nordenskiöldii* と *Chaetoceros debilis* を対象にブルーム形成時の表層（10m）と亜表層クロロフィル極大（SCM、30m）におけるメタトランスクリプトーム解析を行った。室内培養により明らかにされた *T. nordenskiöldii* の転写産物のうち86%が、実際に環境中のブルーム形成期に発現していることが確認され、そのうち1,100（3%）の転写産物で、表層とSCM間で発現量に有意な差が見られた。SCMではケイ素輸送体遺伝子やDNA複製関連遺伝子の発現量が上昇していた。これは、*T. nordenskiöldii* がSCMでより活発に細胞分裂を行っていることを示唆する。窒素代謝関連代謝遺伝子に注目すると、*T. nordenskiöldii* の硝酸輸送体遺伝子が表層で、アンモニア輸送体遺伝子がSCMで発現上昇しており、水深によって窒素代謝が異なることが示唆された。*C. debilis* では対照的に、表層ではアンモニアや尿素輸送体遺伝子が発現上昇していた。これは、親潮域に見られる珪藻ブルームにおいて、種によって異なる窒素代謝機構をもつことを示す。さらに、*T. nordenskiöldii* の培養株を用いて環境変化を考慮した室内培養実験を行っており、上記発現変動の要因について考察する。

加山 基¹, 四本木 彰良¹, 松田 知樹¹, 日高 清隆², 石川 輝³, 柏山 祐一郎¹¹福井工大・環境食品, ²中央水研, ³三重大・院生物資源

地球上に存在する海域の大半を占める貧栄養海域では、ピコ藻類 (*Prochlorococcus* spp., *Synechococcus* spp.等) が基礎生産者として優占している。フィルターフィーダーによる捕食が不可能なこの極微細なピコ藻類については、食胞作用による捕食をおこなうプロティストが直接の捕食者であり、よって貧栄養海域の食物網の基部を形成していると考えられる。従って、プロティストの多様性や生理を知ることは、外洋生態系のエネルギーフローを理解する上で重要である。本研究では、太平洋の黒潮流軸以南の海域でサンプリングした海水試料を用いて、*Prochlorococcus marinus* NIES-2087などピコ藻類の培養物を船上で添加・培養実験をおこない、増殖したプロティストを分離して複数の単離培養株を得た。シアノバクテリアを餌とした培養物のDNA抽出物から、プロティストの18S rDNAをPCR法で増幅しシーケンス解析をおこない、得られた配列に基づく分子系統解析を行った。解析をおこなった単離株のうち、4株はStramenopilesに属し、SNK001株とSNK010株は*Developayella*属 (Bigyromonadea, Pseudofungi), SNK004株およびSNK009株は*Bicosoecida*属 (Bicoecia, Opalozoa) にそれぞれ近縁であることが示された。また、SNK003株およびSNK008株は*Goniomonas*属 (Goniomonadea, Cryptophyta) に分類された。これらの単離株についてNIES-2087との二員培養系を確立した。これら培養物の懸濁粒子を高速遠心機で沈殿させて、抽出物を分析したところ、SNK003, 004, 008の3株については3,8-Divinyldichlorophyll *a/b* (CPE化合物の一種であるDV-Chl-*a/b*)の代謝物として3, 8-Divinyldichlorophyll-13²,17³, -cyclopheophorbide *a/b* enol (DV-cPPB-*a/b*E)が検出された。現在、新たに採取、培養した*Prochlorococcus*捕食性のプロティストをスクリーニングし、分子生物学的な解析を進めている。

水谷 雪乃, 福崎 智司, 田中 礼士
三重大・院生資

【目的】Epsilonproteobacteria綱細菌には深海底に生息する腹足綱アルビンガイ (*Alviniconcha* sp.) のエラ細胞内において宿主と栄養共生関係を築いている種 (Urakawa et al., 2005) や、オハラエビ (*Alvinocaris longirostris*) のエラに外部共生している種 (Tokuda et al., 2007) などが含まれる。このように、本細菌群は深海底環境に生息していることが示唆されるが、浅海に生息する生物からの報告は少ない。よって、浅海に生息する無脊椎動物にも深海と同様に多様なEpsilonproteobacteria綱細菌を保持する宿主がいるのではないかという考えのもと、本研究ではアワビを選択し、これらのエラを対象に次世代シーケンサーを用いた細菌相解析を行った。【方法】 2015年12月に南伊勢の種苗センターで養殖されたメガイアワビ5個体より、エラを切り出した。これらをビーズ・ビーターにより破碎し、キットを用いてDNAを抽出した。得られた精製DNAをからPCR法により16S rRNA遺伝子のV1-V2領域をターゲットとしてライブラリーの調整を行い、Illumina Miseqに供した。既存のシーケンスとの相同性解析にはQiimeを用い、97%を閾値としてクラスタリングを行った。【結果】メガイアワビのエラではEpsilonproteobacteria綱細菌が優占しており、検出された全リード数の41.2%を占めていた。これらは *Arcobacter* 属、 *Sulfurovum* 属など6つのゲノムタイプにアノテーションされたが、検出されたEpsilonproteobacteria綱細菌の約97%をdenovo1546タイプが占めていた。このdenovo1546タイプは既存の種とクラスターを形成せず、水深200-400mの深さに生息している巻貝のエラ (Zdinden et al., 2010) および二枚貝のエラ (Brissac et al., 2010) から検出されたシーケンスデータと最も高い相同性を示した (相同性はともに96.7%)。これにより、アワビのエラにはEpsilonproteobacteria綱細菌、特に未培養の一群が生息していることが明らかになった。また、優占種であったdenovo1546タイプは他の軟体動物のエラからも検出されたことより、この細菌は海産無脊椎動物のエラに特異的に生息している可能性が考えられた。

光信 智恵¹, 長濱 統彦¹, 小林 英城²¹ノートルダム清心女子大学人間生活学研究科食品栄養学専攻, ²JAMSTEC海洋生命理工学研究開発センター

微胞子虫は、動物に偏性細胞内寄生する原虫様病原体であるが、近年ミトコンドリアを欠く特殊化した菌類であることがわかってきた。その多様性は主に宿主病巣から見いだされたものから理解されており、環境DNAの貢献は乏しい。また、真核生物ユニバーサルプライマーでは増幅されない特殊な系統群である。そのため、1) 微胞子虫特異的PCRプライマーを評価・改良し、2) 様々な水環境から指標遺伝子に基づく探索を試みた。当初、既知プライマーによる増幅を試みたが、決定した配列全てアーキア由来であったため、代表的な微胞子虫SSU (18S) rRNA遺伝子のコンセンサス配列に基づき、8種の微胞子虫特異的プライマーをデザインした。これらプライマーペアを用いて、湖沼堆積物や表層水から抽出した33種の水環境DNAから微胞子虫SSU rDNAの増幅を行い、作成したクローンライブラリからクローンDNA塩基配列をランダムに決定した。99%以上相同なDNA配列をOTUとして取り扱い、Blastnにより得られた近縁配列や既知の代表的配列と共に、微胞子虫全体のなかでの進化学的な位置を推定し、個々の環境における微胞子虫の多様性と、宿主や地理的分布との関係を考察した。新プライマー8種のうち、直接微胞子虫が検出されたプライマーは5種（3ペア）であった。湖沼を中心とした33の水環境サンプルのうち、19（58%）から微胞子虫DNAの増幅が見られた。増幅産物から得られた23のクローンライブラリから186配列を決定し、36 OTUsを見いだした。複数の微胞子虫OTUが出現したクローンライブラリは13個（57%）であった。blastnによる相同性解析の結果、相同性98%以上のOTUは5.9%、95~97%は25%、90~94%は28%、90%未満は42%であり、大半が未知種であると推定された。微胞子虫は5つのクレードから成ることが知られているが、うち3つのクレード（I、IV、V）に本研究のOTUsは分布した。最近縁配列からOTUの宿主を推定したところ、近縁な微胞子虫が甲殻類由来であるものは相同性が90%以上のものが多く、甲殻類またはそれに近い生物に寄生していたと予測された。コケムシやウズラなどその他の宿主との関連が示唆されたOTUは全体的に相同性が低く、それら以外の未知宿主を持つ可能性が大きいと考えられた。クレードI、クレードIVではヨコエビやミジンコなどの甲殻類に寄生する微胞子虫が優占したが、クレードVではコケムシに寄生するものも多く見出された。

中小路 薫, 花田 智
首都大・院生命

無機物を電子供与体とした光合成は嫌気性酸素非発生型光合成細菌にとっては一般的であり、用いられる電子供与体としては硫化水素、水素、二価鉄が知られている。2007年と2010年にはコンスタンツ大学の Schinkらの研究グループによって亜硝酸を電子供与体として光合成を行う2種類の光合成細菌の発見が報告された。しかし、アンモニアを電子供与体として光合成を行う光合成細菌は見つかっていない。我々はアンモニア酸化光合成細菌の環境中からの分離培養を世界に先駆けて試みた。サンプリングは宮城県の松島の海岸で行なった。アンモニア酸化は青色光と有機物に阻害されることが知られている。バクテリオクロロフィルの吸収波長が赤外光であることを考慮して培養では700nm以下の波長をカットした。嫌気条件下の元、アンモニアを唯一の電子供与体とする無機培地で好気性アンモニア酸化細菌の至適温度である28℃での培養を試みた。この条件で生育する細菌は嫌気条件で光を利用してアンモニア酸化し、エネルギーを得ていると考えられる。完全な無機の液体培地で培養液が約2週間で赤色を呈することを確認できた。この発色は光合成細菌の存在を示唆する。顕微鏡で細胞長2-3 μ mの短桿菌が観察され、バクテリオクロロフィルaの蛍光も見られた。培養によって得られたサンプルの16S rRNA遺伝子及び、光合成反応中心タンパク遺伝子配列に基づく系統解析からGammaproteobacteria綱に属する紅色イオウ細菌のMarichromatium sp.であることが示された。また全光照射で培養したものは700nm以下の波長をカットしたものに比べ、明らかに増殖抑制が確認された。従来、アンモニアの酸化は好気条件でのみ起きると考えられて来たが、赤外線照射によって嫌気条件においても起こり得ることが明らかとなった。この嫌気条件でのアンモニア酸化はMarichromatium属に属する酸素非発生型の光独立栄養細菌によって行なわれるものであり、世界で初めての報告である。酸素非発生型光合成細菌による嫌氣的亜硝酸酸化だけでなく、同様にアンモニアも酸化され得るとの発見は、これまで嫌気条件下のみで行われてきた廃水処理における高速化・効率化に繋がる研究シーズと言えよう。

出井 愛理¹, 松浦 克美¹, Shawn E McGlynn²¹首都大・院生命科学, ²東工大・ELSI

Observations of modern microbes in iron rich environments have led to several hypotheses on how microbes precipitate iron by photosynthetic (aerobic and anaerobic) and oxygen metabolisms. The purpose of this study is to evaluate the growth of cyanobacteria in modern iron rich environment and the interaction with iron under Fe(II) rich conditions. The sampling site was Jinata hot spring in Shikine-island, Tokyo prefecture. Spring water was found to contain about 200uM Fe(II), and we observed green microbial mats dominated by filamentous cyanobacteria on iron sediments. In the sediments, unicellular cyanobacteria were observed. From the mats and sediments, we obtained enrichment cultures comprised of mainly cyanobacteria (around 90%). The filamentous cyanobacteria are *Leptolyngbya* sp. and Unicellular are *Chroococcus* sp. relatives according to *psaA* gene analysis. The experiment of tolerance to iron showed *Chroococcus* sp. grow constantly in 1mM Fe(II), concentrations which led to decreased growth in other species. The presence of cyanobacteria on the sediments suggests that evolved oxygen may lead to iron precipitation and sedimentation. The diversity of cyanobacteria and the growth experiments suggest that cyanobacteria from iron rich environments were likely to adapt to Fe(II) rich environments.

古屋 俊樹^{1, 2}, 中尾 友美¹, 木野 邦器¹¹早稲田大・理工・応用化学, ²東京理科大・理工・応用生物科学

【目的】アセトンは溶媒や化学品原料として広く使用されており、また、アセトンは代謝中間体として生成することもあるため、生態系や生体内におけるその代謝は古くから研究されている。アセトンはおもにアセトアセレート、メチルアセレート、アセトールのいずれかを經由して代謝される。アセトンをアセトアセレートおよびメチルアセレートに変換する酵素はすでに同定されているが、アセトールに変換する微生物酵素は不明のままである。本研究では、アセトン資化性を有することが明らかにされている*Mycobacterium*属細菌のアセトン変換酵素の同定を試みた。【方法・結果】アセトンを資化できる*Mycobacterium goodii* 12523株のアセトン誘導性タンパク質を二次元電気泳動により解析し、その1つとして二核鉄型酸化酵素MimABCDを同定した。MimABCDをコードする遺伝子と相同の遺伝子は、ゲノム配列が明らかにされている*Mycobacterium smegmatis* mc²155株にも見いだされた。そこで、mc²155株もアセトン資化性を有していることを確認し、本株の*mimA*遺伝子を破壊したところ、その資化性は消失した。一方、12523株もしくはmc²155株の*mimA*遺伝子を破壊株に相補したところ、アセトン資化性は回復した¹⁾。さらに、*mimABCD*遺伝子を大腸菌内で発現させて触媒活性を評価したところ、MimABCDはアセトンをアセトールに変換する活性を有していた^{2,3)}。本研究は、アセトンをアセトールに変換する微生物酵素を同定した初めての例である。1) T. Furuya, et al., Appl. Environ. Microbiol., 77, 1214-1220 (2011). 2) T. Furuya, et al., Appl. Environ. Microbiol., 79, 6033-6039 (2013). 3) T. Furuya, et al., FEMS Microbiol. Lett., 362, fmv136 (2015).

宮内 啓介, 伊藤 凌, 今野 涼平, 鈴木 雅宏, 渡辺 蓮也, 遠藤 銀朗
東北学院大学工学部

ヒ素高蓄積植物であるモエジマシダは、ヒ酸を根から取り込むことが知られている。亜ヒ酸は根圏でヒ酸に変換されてから取り込まれるが、この亜ヒ酸酸化には根圏に存在する細菌群が関与していると考えられている。我々はモエジマシダの根から単離した細菌の中に、亜ヒ酸酸化活性をもつ*Pandoraea* sp. NE5株を見いだした。本研究では、NE5株において亜ヒ酸酸化に関わる遺伝子群の同定を試みた。まず、NE5株のトランスポゾンライブラリーを作製した。ゲノム中にトランスポゾンがランダムに挿入されていることを確認した後、約3000コロニーを亜ヒ酸存在下で2日間培養した。培養液中の亜ヒ酸の有無を、当研究室で作製した亜ヒ酸に反応して発光するレポーター細菌を用いて測定した。選抜した株については、原子吸光光度計を用いて再度亜ヒ酸酸化能を測定し、亜ヒ酸酸化能が低くなった株を同定した。得られた株のトランスポゾン挿入部位を同定した結果、molybdenum ABC transporter ATP-binding proteinや金属応答転写制御因子に隣接するhypothetical proteinに相同性を示す遺伝子等が同定された。しかし、亜ヒ酸酸化酵素遺伝子と相同性を示す遺伝子は同定されなかった。現在、引き続きスクリーニングを行うと共に、上記遺伝子群の亜ヒ酸酸化への関与について解析を行っている。

武尾 正弘¹, 山本 健太¹, 園山 雅史¹, 宮永 佳奈¹, 神原 奈那¹, 本田 航一¹, 長尾 亮佑¹, 加藤 太一郎², 根来 誠司¹
¹兵庫県大院・工, ²鹿児島大院・理工

3-メチル-4-ニトロフェノール (3M4NP) は、有機リン酸系農薬フェニトロチオンの代謝物として土壌から検出される毒性化学物質であり、環境ホルモン作用の疑いも指摘されている。3M4NPの分解については、*Burkholderia* sp. NF100株などでその分解経路がかなり突き止められているが、未だに完全な分解経路の解明に至っていない。本研究では、畑地土壌より分離した3M4NP分解菌*P. putida* TSN1株について、トランスポゾン変異を用いた関連遺伝子のクローニングと変異株の代謝物分析などを通じて分解経路の解明を実施したので報告する。TSN1株にmini-Tn5を有するトランスポゾンベクターpCro2aを接合伝達により導入し、トランスポゾン変異株の取得を試みたところ、3M4NPから暗いピンク色物質を蓄積する3株の変異株が得られた。これらの変異株の培養液から、2-ヒドロキシ-5-メチル-1,4-ベンゾキノン (2H5BQ) とその還元型である2,4,5-トリヒドロキシトルエン (245THT) の2つの中間体が検出された。これらは、既知の3M4NPの分解中間体であるメチルヒドロキノン (MHQ) からも検出された。また、これらに関連する2つの遺伝子*mnpCB*が分離された。一方、3M4NPからMHQへの酸化を担う酵素の遺伝子を探索したところ、既知のp-ニトロフェノールモノオキシゲナーゼとp-ベンゾキノンレダクターゼの遺伝子と相同な*mnpA1A2*遺伝子群が見出され、これらの遺伝子破壊、粗酵素や純化酵素を用いた分解研究で、3M4NPからメチルベンゾキノン (MBQ) を経由してMHQに至る経路との関係を証明することができた。以上の結果から、TSN1株は、異なる遺伝子座に存在する*mnpCB*及び*mnpA1A2*を用いて、3M4NPを、MHQ, MBQ, 2H5BQ、246THTを経由して分解することが明らかになった。

本研究では加硫天然ゴムを分解する木材腐朽菌について報告する。鳥取県東部の天然林で分離した木材腐朽菌の高分子材料の分解ポテンシャルを調べるうち、一部の木材腐朽菌が市販の加硫天然ゴムシートの分解劣化を引き起こし、物性を大きく低下させることが明らかとなった。この結果は著者がこれまでに報告した海外の菌よりもはるかに分解力の強いものであり、国内で採取されたものでは初めての成果である。木材腐朽菌による加硫ゴムの分解について、現在化学的な分析を進めている。

Abinubli Tariswafi Mawarid¹, 酒井 康輝^{1, 4}, 長谷川 泰久², 佐藤 剛一², 葉坂 勝⁴, 佐藤 真哉³, 横田 明¹, 阿部 敬悦¹, 矢部 修平¹

¹東北大院・農, ²産総研・化学プロセス, ³仙台環境開発株式会社, ⁴株式会社県南衛生工業ハザカ研

【目的】有毒で腐食性のガスである硫化水素はバイオガス、製紙工場、埋立処分場などで発生し、一般的に酸化鉄などを用いて化学的に処理されている。しかし、コストや環境負荷の面で優位なバイオフィルター法への転換が求められている。理想的なフィルター素材は高濃度の硫化水素をトラップでき、それを代謝し無害化できる細菌群が集積される適切な物理化学的特性や栄養分を有する事が重要である。演者らは、コンポストが環境保全の観点からも画期的なバイオフィルター素材として活用できると推察し、基盤技術の確立を目指している。一方、コンポストを含む生物処理法に関しては既に多くの研究及び実用例があるが、効果が不安定でメカニズムが未解明なため装置設計も経験則に基づく事が多く、それが普及の妨げとなっている。本研究では安定した性状と微生物叢を有するコンポストを継続製造可能な実用大規模プラントを用い、投入原料別コンポストの硫化水素除去率の違いを調べた。また、埋立処分場にて簡易実証試験を行い、微生物叢の変動も解析した。【方法及び結果】

φ20×300mmのカラムに投入原料の異なる各種コンポスト（牛糞①、食品残渣②、鶏糞③、魚介廃棄物④）及び土壌やパーミキュライト及び酸化鉄を3cm3充填し、そこに硫化水素を100ppm、流速100ml/minの条件で通し（ガス接触時間約2秒）、除去率を調べた。その結果、コンポスト②と酸化鉄は除去率90%以上、コンポスト③は48%、その他は23-26%となった。トラップ能の高かったコンポスト②を充填剤として用いた200L規模の簡易リアクターを製作し、埋立処分場に設置して処理前後の硫化水素濃度と微生物叢を調べた。その結果、除去効果は1年以上維持され、処理前は乳酸菌 *Lactobacillus* 属が優占したが、約1年間処理後は通常海洋環境に棲息する硫黄酸化細菌 *Thiomicrospira* 属が優占した。

嫌氣的脱塩素分解を利用したクロロエチレン類のバイオレメディエーションが実用化されているが、高濃度の汚染サイトでは微生物分解が困難であり、他の浄化手法が適用されている。クロロエチレン類の嫌氣的脱塩素分解は、微生物による硫酸還元、発酵等のプロセスと共に生じることが知られている。本研究では、高濃度のテトラクロロエチレン（PCE）が、脱塩素分解およびこれらのプロセスへ与える影響を解明することを目的に行った。PCEを、トリクロロエチレン（TCE）、*cis*-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）、クロロエチレン（VC）を経てエチレンへ脱塩素分解可能な微生物コンソーシアムを作製した。バイアル瓶中で、本コンソーシアムと塩類培地、電子供与体として、酢酸、乳酸、メタノール、イーストを混合した。さらにPCEを1.5-150 mg/Lの8段階の濃度で添加し、ヘッドスペースのクロロエチレン類、エチレンおよび水素濃度をGC及びGC-MSで経時的に分析した。培養液を採取し、遠心分離後のペレットをDNA抽出に、上澄みをイオンクロマトグラフによる陰イオン分析およびHPLCによる有機酸分析に供試した。初期PCE濃度1.5-30 mg/Lでは嫌氣的脱塩素分解が生じ、PCEは24日目までに環境基準値以下に減少し、分解産物であるTCE、*cis*-DCE、VCが生成した。一方、初期濃度125 mg/L以上では、24日目で90%以上のPCEが残存し、高濃度PCEによる脱塩素分解の阻害が示された。実験開始時に79.2 mg/Lであった硫酸イオン濃度はPCE分解と共に減少し、初期PCE濃度1.5-30 mg/Lでは実験開始6日目に、初期PCE濃度75 mg/Lでは9日目に、5.3 mg/L以下にまで減少した。初期PCE濃度125-150 mg/Lでは、顕著な減少はみられなかった。高濃度のPCE存在下では、硫酸還元が阻害されている可能性が示唆された。また、初期PCE濃度125-150 mg/Lでは、低濃度のPCEを加えた条件と比較して酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸濃度が低く、電子供与体由来する有機物の醗酵が抑制されていることが推察された。以上の結果から、高濃度のPCEは脱塩素分解を担う微生物のみならず、硫酸還元や発酵プロセスを担う微生物の活性を阻害していると結論付けられた。

綿引 沙織^{1,2}, 木村 信忠^{1,2}, 山副 敦司³, 三浦 隆匡³, 野田 尚宏⁴, 松倉 智子⁴, 高畑 陽⁵, 野尻 秀昭⁶, 福田 雅夫⁷

¹筑波大院・生, ²産総研・生物プロセス, ³NITE, ⁴産総研・バイオメディカル, ⁵大成建設, ⁶東大・生セ, ⁷長岡技大・生物

【目的】本研究では、塩素化エチレン類であるトリクロロエチレン (TCE) 及び *cis*-1,2-ジクロロエチレン (cDCE) で汚染された土壌・地下水を対象にしたTCE/cDCE分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 を導入するバイオオーグメンテーション法の実証試験を行い、次世代シーケンサー (NGS) を利用した微生物生態系の多様性評価を行った。また、導入した RHA1 株の消長と TCE/ cDCE 分解時に発現が変動する遺伝子群の解析を行った。【実験方法】 TCE/ cDCE により汚染されたサイトに注入井戸1ヶ所及び観測井戸3ヶ所の設置を行った。ファーマンターによる通気攪拌条件で RHA1 株の純粋培養を行った。遠心分離で集菌後にリン酸ナトリウム緩衝液に懸濁した RHA1 株(約 1.0×10^{14} 個)を酸素と共に注入井戸へ導入し、注入直後、注入1日後、6日後、19日後に注入井戸より地下水2 Lをサンプリングした。また、コントロールとして注入30日前に同様に地下水をサンプリングした。採取したサンプルから RNA 及び DNA の抽出を行い、更に RNA については Ribosomal RNA を除去し、cDNA の合成を行った。塩基配列の決定は、Illumina 社 HiSeq 1000 system により実施した。微生物叢の解析は、メタゲノム解析用パイプラインである MG-RAST を利用した。また、RHA1 株の発現量解析については、統計解析ソフトであるRを利用した。【結果】メタゲノム解析の結果および物理パラメータより、注入直後においてRHA1が優先種となり、TCE/cDCEの分解を行ったことが確認された。加えて、PCoA解析の結果、急激な微生物叢の変化が観察されたが、酸素の消失によりRHA1 株の菌数が減少し、それに伴い微生物叢が添加前の状態へと徐々に回復する傾向が観察された。しかしながら、Day6以降は、嫌気状態となり、還元的脱塩素化細菌である *Dehalococcoides* などがTCE/cDCEの分解に関与したと考えられる。また、メタトランスクリプトーム解析によりRHA1の遺伝子発現量の変化をDay0とDay1において2群間比較をした結果、TCE/cDCEの初期分解に関与すると推定されるビフェニル酸素添加酵素群の発現がDay0において確認された。以上の結果より、RHA1は、注入直後においてTCE/cDCEの分解に寄与していると考えられる。

鈴木 市郎^{1, 2}, 田 小維², 木村 遼一¹, 長谷川 愛³, 山崎 祐二³, 小林 剛^{2, 4}

¹横国大・院工, ²横国大・リスク共生セ, ³(株) 竹中工務店, ⁴横国大・院環

【緒言】 TCEなどの揮発性有機塩素化合物の生物的浄化において、短期間化を図るため加温により脱塩素化を促進することが考えられる。15℃から35℃までの培養温度でTCEを添加した培地で*Dehalococcoides*属を含む集積培養系を接種し培養した結果、TCEからcis-DCEへの脱塩素化速度定数は30℃が最も大きかったのに対し、反応で生じたcis-DCEおよびVCの脱塩素化では25℃が極大を示した(1)。そこで、各温度における細菌叢の動態を次世代シーケンスにより解析した。

【方法】 TCE脱塩素化実験で経時的に採取したサンプルよりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV4領域を含む約250 bpをPCRで増幅した。Illumina MiSeqによる塩基配列解読後、Qiimeで分類的操作単位(OTU)に振り分けた。優占度の上位を占める各OTUの経時的な量的変化をHorn指数を用いて比較し、類似した動態を示すOTUを階層的クラスタリングで分割して動態をグラフ化した。

【結果】 優占度の90%を占める上位292 OTUsをクラスタリングし、13のクラスターに分割した。25℃で増殖の極大を示したクラスターは1つのみで、その中に*Dehalococcoides*が含まれていた。一方、25-30℃で高い増殖を示した3つのクラスターにはTCEからcis-DCEへの脱塩素化が報告されている*Desulfosporospora*の近縁種が含まれており、30℃でのTCEの脱塩素化はこれら細菌群の関与によることが示唆された。

(1) Tian *et al.*, Water and Environ. Technol. Conf. 2016 (WET2016), 3A-08 (2016)."

八田 貴, 松原 光悦
岡山理大・工・生命医療

【目的】有機塩素系農薬のダコニール [2,4,5,6,-tetrachloroiso phthalo nitrile (T P N)] は広範囲の作物の病気に防除効果を示す総合殺菌剤で、4つの塩素原子を含む芳香族有機化合物である。世界的に使用され、特に中国では有機塩素系農薬としては最も多く使われている。日本では一般家庭でも園芸作物の病気に対して用いられる。しかしT P Nが雨水にともなって河川などに流出した場合は魚介類に対し強い毒性を示す。発がん性については国際がん研究機構IARCのgroup2Bに属している。本研究では、中国・インド・東南アジア等の土地が平坦で雨水や河川によって流出されにくく、T P N を多量に使用している汚染圃場のT P Nの分解除去を目的として分解に対する土壌の役割を検討し分解菌の単離を試みた。 【方法】長期間TPNを使用していた畑から土壌サンプルを採取した。30 ml容サンプルチューブに採取した土壌と固体のT P Nを0.5 mg加え、1ヶ月以上集積培養を行った。バツフル付き三角フラスコを用い、無機塩培地に50 PPMのT P Nと3%の畑の土を加え、30°Cで振盪培養した。チオンシアン酸水銀法を用いてT P Nから分解遊離した塩素イオンを定量することにより分解性を調べた。また、畑の土以外に、赤玉土、鹿沼土、パーミキュライト、カオリナイト、パーライト等の種々の土壌を培養液に加えて分解特性を調べた。さらに、塩素イオンが増加した培養液をR2A寒天培地にプレーティングし、コロニーを単離し分解菌の同定を行った。 【結果】集積培養した土壌はTPNを分解し、塩素イオンの増加が確認された。無機塩培地のみではTPNを分解しなくなったが、培地に土壌を加えることで分解特性が向上することが明らかとなった。畑土以外ではパーミキュライト、カオリナイト等がTPNの分解が促進した。土の種類によって分解性が全く異なることが明らかとなった。分解培地中から2種の菌株が単離され、これらは16SrDNA配列より α -proteobacteriaの*Rhizobium tumefaciens*と β -proteobacteriaの*Paraburkholderia fungorum*と同定された。

浦田 智宇¹, 三好 佑奈², 新谷 政己^{1, 2}, 金原 和秀^{1, 2}¹ 静大院・総合技科, ² 静大・工

【目的】油類の流出による土壌汚染は、世界中の様々な場所で起きている。分解微生物を投入するバイオオーグメンテーションは、汚染土壌を浄化する手法の一つであり、従来の土木的浄化手法と比べて、低コスト・低環境負荷であると考えられている。しかし、微生物を用いた浄化は、土壌の性状や気象条件など、汚染現場の環境条件に結果が左右されやすいことや、処理に時間がかかることから確実性が低いという問題点がある。そこで、処理速度の速い浄化技術を開発する必要がある。我々は、*Rhodococcus erythropolis*に属する2種類の油分解菌を用い、15℃の低温静置条件においてモデル土壌中のA重油の効率的分解をこれまで発表している。本研究では、低温におけるA重油汚染土壌の浄化の高速化を目的とし、回転型バイオリアクタを用いてモデル土壌をスラリー化してA重油分解試験を行い、その分解能を評価した。【方法】赤玉土300 g、芝目砂200 g、無機培地であるW培地332 mLを混合したモデルスラリーを調製し、15℃で1日攪拌した後、*Rhodococcus erythropolis* 2株の濃縮菌液を、それぞれ 1.0×10^8 cells/g-soilとなるように接種し、500 mg/kgならびに2500 mg/kgのA重油を加えた。15℃の温度条件で3日または6日間分解試験を行い、一定期間ごとにA重油残存濃度および菌数の測定を行った。A重油残存濃度は、ヘキサン抽出しGC-FIDを用いて定量した。菌数の測定は、抽出した菌液を1/3に希釈したLB寒天培地上に塗布し、生じたコロニー数(CFU)を計測した。【結果と考察】A重油初期濃度500 mg/kgでは、24 h以降A重油の大きな減少が認められ、72 h後に97%以上の減少が見られた。A重油初期濃度2500 mg/kgでは、96 h後に97%以上が減少した。以上の結果により、静置条件では12日間かかる分解期間を、回転型リアクタを用いることで3分の1に短縮可能であると示唆された。また、A重油初期濃度500 mg/kgにおける72 h後の菌数は、初期値の約2.6倍となり、若干の上昇が認められた。A重油初期濃度2500 mg/kgでは、菌数は48 hまで減少し、その後に上昇したが初期値よりも低い値となった。以上の結果、回転型スラリーバイオリアクタでモデル土壌中のA重油の高速分解が示唆された。現在、遺伝子発現など、分解メカニズムの基礎を解析中である。

山下 美雪¹, 山梨 由布¹, 宮崎 有希², 伊藤 司¹¹群馬大・院理工, ²群馬大・理工

染料は繊維染色、化粧品、食品などの様々な分野で使用されている。染料が水環境中に排出された場合、自然には分解され難く残留性があるため水環境汚染を引き起こす。染料廃水の処理方法として、特定の微生物を用いた生物学的脱色が以前から報告されている。しかし、染料脱色能力を持つ微生物を得るためには、実際に時間をかけて染料脱色能力の有無や脱色能力の高さを検討する必要がある。時間のかかる脱色実験を行わずに染料脱色能力の有無やその高さを評価できる選別方法はない。本研究は脱色実験を行わなくてもできる染料脱色能力の高い微生物の選別方法を確立することを目的とした。選別方法を検討するために、染料が微生物の増殖に与える影響、続いて、微生物の運動性と染料脱色能力の関係について調査した。染料が微生物の増殖に与える影響は、染料濃度を段階的に振った寒天培地で対象微生物を培養し、微生物のコロニー数をカウントすることにより評価した。その結果、染料濃度が脱色可能な条件のとき脱色菌の出現コロニー数は染料が無い条件よりも増加し、増殖が促進されるという結果が得られた。このことから、適切な染料濃度に調整し、コロニー数やコロニーの大きさなど寒天培地上での挙動を評価することにより脱色菌と非脱色菌と区別できる可能性が示された。そこで、染料脱色能力と運動性との関係を、染料を添加した軟寒天培地上でのSwarming運動と、別途行った対象微生物の染料脱色能力の評価結果と比較した。ここで、Swarming運動とは寒天濃度が0.3～0.5%程度の軟寒天培地上での鞭毛による運動のことであり、本研究ではSwarming運動によるコロニーの広がりから運動性を判断した。その結果、脱色可能な濃度の染料が軟寒天中に含まれていた場合、脱色菌は運動性を示した。一方、非脱色菌は運動性を示さなかった。染料が非脱色菌のSwarming運動を阻害し、脱色菌に対しての阻害影響は小さいという結果が得られたことから、染料を添加した軟寒天培地上で微生物のSwarming運動を調べることで染料脱色能力の高い微生物の選別に利用できる可能性が示唆された。

松井 一彰¹, 鈴木 孝司¹, 簡 梅芳², 遠藤 銀朗³¹近畿大・理工, ²東北大・院環境, ³東北学院大・工

自然界には、有害重金属である水銀を還元気化させることによって耐性を獲得した水銀耐性細菌が存在する。水俣湾底泥より分離された*Bacillus megaterium* MB1株は、有機水銀分解酵素遺伝子*merB*と水銀イオン還元酵素遺伝子*merA*を保持しており、無機水銀と有機水銀の両方に耐性を示す。有機水銀は生物に濃縮されやすい性質を持つが、水俣湾底泥では、これらの細菌が生物に取り込まれる水銀の量を減少させていたとも考えられている。近年の研究にて、*B. megaterium* MB1株と相同な水銀耐性遺伝子群が、アメリカのボストン湾や南極の東オングル島などの地理的に離れた場所の*Bacillus*属細菌からも発見されている。このことは、水銀耐性遺伝子を持つBacilliが広く地球上に分散し、水銀循環に重要な役割を果たしている事を示唆している。しかし環境中における水銀耐性Bacilliの分布や存在量については全くわかっておらず、環境試料から簡便かつ定量的に評価できる手法の確立が望まれている。そこで本研究では、土壌中の水銀耐性Bacilliを計数するための定量PCR法を検討した。まず*B. megaterium* MB1株の*merA*遺伝子と*merB1*遺伝子を対象とした定量PCR用プライマーとTaqManプローブの組合せを比較検討し、PCR反応液あたり25コピー以上の遺伝子を検出できるプライマー・プローブセットを実験的に確認した。次に土壌中の水銀耐性Bacilliの定量評価を目的に、土壌特性の異なる水田、都市公園の植栽地、運動用グラウンドの土に*B. megaterium* MB1株を添加し、回収したDNA中の水銀耐性遺伝子数を定量してプライマー・プローブセットの有効性を評価した。土壌より回収したDNAからは、添加した水銀耐性細菌の24%~60%に相当する水銀耐性遺伝子を検出できた。土壌からのDNA回収率や土壌からの夾雑物混入による影響の差異も含めて、土壌1 gあたりに10,000コピー以上の水銀耐性遺伝子が存在していれば、今回検討した全ての土壌試料から水銀耐性遺伝子の定量が可能であった。以上の検討結果を基に、地理的に離れた土壌試料中の、水銀耐性遺伝子（*merA*および*merB1*）の現存量を測定した結果も合わせて紹介する。

小林 隆一, 内野 佳仁, 川崎 浩子
NITE・NBRC

自然環境や物質生産などのバイオプロセスにおいて、微生物の動態を知る技術は代謝系の理解やその制御のために非常に重要である。その中でも特定の微生物を検出する技術は、欠くことのできない要素であると考えられる。我々はそのような検出技術として、アプタマーによる特定微生物の検出に関する研究を行っている。アプタマーは一本鎖のオリゴヌクレオチドにより構成される分子で、その配列により特異的な高次構造を形成する。この構造によりアプタマーは様々な標的に対し、電子親和性や構造親和性をはじめとした各種親和性に基づき、特異的に結合することが知られている。このようなアプタマー分子に蛍光標識を行うことで、結合した標的を蛍光で検出することが可能となる。これを利用し、特定の微生物に結合するアプタマーを取得できれば、その微生物を蛍光で検出する事で、より正確な定量が可能となると考えられる。そこで本研究では、特定微生物の細胞表面に特異的に結合するアプタマーの取得を行い、蛍光顕微鏡での観察を試みた。特定の微生物に対し、特異的に結合するアプタマー分子の取得方法としてSELEX法（ランダムオリゴライブラリに対して、①標的との結合、②非結合配列の除去、③結合性配列の回収と増幅のサイクルを繰り返すことで、標的へ結合するアプタマー分子を選択的に取得する方法）によるセレクションを行った。本研究ではアプタマー分子として、RNAと比較してより扱いが容易かつ柔軟性が高いとされているDNAを用いることとし、4つのランダムDNAライブラリに対し、標的微生物に特異的に結合するアプタマーのセレクションを行った。標的微生物としては、塩素化エチレン類を脱塩素化する微生物コンソーシアムから分離された、*Sulfurospirillum* sp. UCH001株を用いた。

15回のセレクションを行い、得られたライブラリの解析を行ったところ、2種類の配列が複数のライブラリから非常に高い割合で検出された。これらの配列が高い結合性を有する配列であると考え、現在親和性の解析を行っている。本発表では、得られたアプタマーの親和性及び特異性、並びにアプタマーを用いた細胞の観察などについて報告を行う予定である。

渡辺 宏紀¹, 稲葉 知大², 尾花 望³, 宮野 泰征⁴, 野村 暢彦³¹筑波大・院生命環境, ²産総研・環境管理, ³筑波大・生命環境, ⁴秋田大・院理工

微生物が原因の金属腐食では、金属腐食が発生しにくいとされる常温・中性環境においても速やかに腐食が進行することが大きな問題となっている。腐食が発生した金属表面では細菌集団と自身の代謝産物で構成されるバイオフィルム (BF) が度々観察されてきた。BF状態の細菌は自由遊泳時とは異なる性質を示すことが知られており、微生物金属腐食においてもBF状態に起因する特殊な生理活性との関連が予想される。当研究室の先行研究により海洋から単離された細菌FT01株は、海水中でステンレス表面上に立体的なBFを形成し、BF下に腐食孔と推測される孔をわずか12時間で発生させる。興味深いことに、16S rRNA解析の結果、FT01株の近縁種による微生物金属腐食の報告はなかった。そこで、本研究では、FT01株のBF形成による金属腐食メカニズムの解明を目的として解析を行った。FT01株をステンレスとともに海水模倣培地中で培養したところ、立体的なBFの形成は見られず、ステンレス上への腐食孔の発生も観察されなかった。海水模倣培地中には鉄イオンが豊富に含まれている一方、自然海水中では局所的に鉄イオンの枯渇が起きることが知られている。そこで、海水模倣培地より鉄化合物を除去して、その影響を解析した結果、FT01株は鉄飢餓状態でのみステンレス上に立体的なBFを形成し、腐食孔を発生させることが明らかとなった。さらに、FT01株とステンレス間の物理的な接触を阻害したところ、鉄飢餓条件下におけるFT01株の生育および、腐食孔の発生が阻害された。以上より、FT01株による金属腐食には、ステンレスへの菌体の付着およびBFの形成が必須であることが示唆された。ステンレス上のBFを経時的に定量した結果、培養時間の経過に伴いBF量の増加と腐食孔の拡大が観察された。一方、培養24時間以降では腐食孔は拡大せず、さらにBF形成量が減少する様子が観察された。この際、培地中に溶出した鉄イオン濃度を経時的に定量すると、腐食孔拡大の様子と一致して培養24時間後まで鉄イオン濃度の増加が観察された。これらの結果より、鉄飢餓状態のFT01株は、ステンレスにBFを形成することによって金属腐食を引き起こし、生育に必要な鉄イオンを獲得していることが示唆された。また、遊離鉄イオン濃度の増加に伴って自発的にBFから脱離し、新たな環境へ遊泳する生活環を有する可能性が考えられた。

嶋田 崇志¹, 上野 菜々子¹, 佐野 由実¹, 梅田 知子², 小山 慎一², 喜多 加代子², 酒徳 昭宏¹, 加賀谷 重浩¹, 中村 省吾¹, 田中 大祐¹
¹富山大・院理工, ²ムラタ計測器サービス(株)

【はじめに】大気中には、細菌、真菌、花粉などの生物粒子(バイオエアロゾル)が存在し、生態系、人の健康、農業、気候に影響を及ぼすことが懸念されている。また、バイオエアロゾルに関する研究は近年増加してきているが、大気中に存在する微生物の時空間的動態や粒径に関する知見は不足している。本研究では、富山市と横浜市にて粒径別に大気試料を採取して、細菌及び真菌の定量を行い、粒径や地域による差の把握を目指した。【材料と方法】大気試料は、富山大学理学部棟と横浜市の建物の屋上(いずれも地上約15m)にて、2016年8月～12月の間に毎週1回、SPM-PM_{2.5}とPM_{2.5}を捕集した。また、同年8月～10月に毎月1回、アンダーセンエアサンプラーによる9段階の分級捕集(分級範囲：0.43～11.0 μ m)を行った。それらの試料からDNAを抽出し、Taq Manプローブを用いたリアルタイムPCR法で全細菌と全真菌の定量を行った。【結果と考察】リアルタイムPCR法を用いた全細菌と全真菌の定量を行ったところ、大気中の細菌と真菌はどちらもPM_{2.5}よりSPM-PM_{2.5}に多く存在すると考えられた。また、全真菌の定量結果からは地域差が認められた。さらに、アンダーセンエアサンプラーで分級捕集した試料でも、細菌と真菌はどちらも粒径2.1 μ m以上の粗大粒子側に多く含まれると考えられ、特に真菌は孢子のサイズである2～5 μ m程度の粒径でやや高い値を示した。今後は、細菌や真菌の密度と化学成分との関連を検討する予定である。

稲岡/Inaoka 隆史/Takashi¹, Nguyen Thi Minh Huyen¹, 中井 雄治², 森松 和也³, 木村 啓太郎¹, 中浦 嘉子¹, 山本 和貴¹
¹農研機構・食品研, ²弘前大・食料研, ³愛媛大・農

"損傷菌は、ストレス等により損傷し、一時的に増殖不能となった状態の細菌である。食品衛生分野での損傷菌に対する関心は高く、食中毒菌等を中心に研究が行われてきた。しかしながら、熱処理による菌の損傷について論じられることが多く、高圧処理による損傷については不明な部分が多い。我々は、大腸菌¹⁾、枯草菌²⁾等の高圧損傷菌の特性について報告してきた。これまでに、孢子形成能を欠失した*spolIAC::kan* (SigF)株を高圧処理（250MPa、25℃、10分間）した場合、LB培地において約3時間の増殖遅延を観察している。同条件で高圧処理した枯草菌栄養細胞は、100mM以上のNaClまたはKCl存在下で溶菌する等、未処理細胞と比較して、明らかな塩感受性を示すことから、同条件で高圧処理した枯草菌栄養細胞の大部分が、損傷状態にあると考えられる。本研究では、高圧処理により一時的に増殖不能となった枯草菌栄養細胞の回復過程における遺伝子発現プロファイルを、マイクロアレイにより解析した。高圧処理直後及び増殖停止期（処理後2時間）、増殖開始期（処理後4時間）の各段階でRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、高圧処理直後～2時間後では、リボゾーム等の翻訳関連因子、コールドショック蛋白質、シャペロン等の遺伝子発現が顕著に増加したのに対して、ストレス耐性に関与する遺伝子発現が低下していた。このことから、高圧処理後初期には、リボゾーム等の翻訳関連因子を優先的に誘導し、高圧損傷により低下した翻訳機能を補強しているものと推察できる。一方、高圧処理後2時間～4時間では、鉄欠乏時に誘導されるFurレギュロンに属する遺伝子群の発現が増加していたことから、鉄に関連するストレス応答機構が誘導されている可能性も示唆された。1) Kimura, K. et al. 2017. J. Biosci. Bioeng. In press 2) Inaoka, T. et al. 2017. Biosci. Biotechnol. Biochem. In press"

Joval N. Martinez^{1, 2}, Marcus Tank¹, Satoshi Hanada¹, David M. Ward³, Donald A. Bryant⁴, Vera Thiel¹

¹Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Japan, ²Department of Natural Sciences, University of St. La Salle, Philippines, ³Department of Land Resources and Environmental Sciences, Montana State University, USA, ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, USA

The depth-dependent distribution of bacteria in hot spring microbial mats is not completely understood. We studied the vertical distribution of phototrophic and chemotrophic bacteria within hot spring associated phototrophic microbial mats collected in Nakabusa (NK, 60°C), Nagano, Japan and New Pit (NP, 57°C), Yellowstone National Park, USA. Mats were separated into five layers and analyzed using 16S rRNA gene amplicon sequencing. The presence of *Thermosynechococcus* in the upper layers of NK mats indicates an oxygenic mat while *Cyanobacteria* were rare in the anoxygenic NP mats. The members of filamentous anoxygenic chlorophototrophic *Roseiflexus* spp. dominated both mats with high microdiversity and increasing abundance with depth. In contrast, *Chloroflexus* spp. were highly abundant in the upper layer of NP mats and decreased with depth. In the NK mats, *Chloroflexus* spp. show maximum relative abundance in the intermediate layer, which correlated with its preference for anaerobic/microaerophilic photosynthetic growth and the gradient of oxygen in these mats. The lower layers of the mats were dominated by sulfur-disproportionating members of *Thermodesulfobacteria* in NK and sulfate-reducing *Deltaproteobacteria* in NP. Other phototrophs were present and differed in abundance with depth, consistent with their different preferences for light and oxygen concentrations.

村上 匠¹, 瀬川 高弘², 竹内 望³, Pedro Labarca⁴, Gonzalo Barcaza Sepulveda⁵, 幸島 司郎⁶, 本郷 裕一¹

¹東工大 生命理工学院, ²山梨大 総合分析実験センター, ³千葉大 院理, ⁴Centro de Estudios Científicos, ⁵Dirección General de Aguas, ⁶京大 野生動物研究センター

【背景】氷河・氷床といった年間を通じて雪氷に覆われた低温極限環境においても、細菌・藻類・無脊椎動物といった生物によって構成される生態系が存在している。そうした雪氷生態系研究の中心は藻類や細菌といった微生物であり、上位の消費者である大型無脊椎動物の生態に関する情報は極めて限定的である。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、南米パタゴニアの氷河に生息するカワゲラ的一种 *Andiperla willinki* の腸内細菌叢を題材とした網羅的群集構造解析およびメタゲノム解析を行った。【方法】氷河カワゲラ幼虫の腸・糞便、および比較対象として生息氷河表面の雪氷試料から核酸を抽出し、研究に用いた。細菌群集構造は、真正細菌の16S rRNAをPCRで増幅し、Illumina MiSeqで網羅的に配列取得することで解析した。また、一部の優占細菌種については、fluorescence in situ hybridization (FISH)によって腸内での局在を確認した。さらに、同じくMiSeqを用いて糞便DNA試料からカワゲラ腸内細菌群集のゲノム断片を網羅的に取得し、腸内細菌群集が保有する代謝機能の推定を行った。【結果・考察】氷河カワゲラの腸内細菌群集構造は生息氷河表面と大きく異なる事が判明した。特に腸・糞便試料からは、*Porphyromonadaceae*科・*Lachnospiraceae*科に代表される、動物の腸内に特異的に共生する細菌系統が豊富に検出された。FISHによって、これら氷河カワゲラ腸内で優占的な複数の細菌種は、腸内で互いに密集して局在していることが明らかとなった。一方で、生息氷河由来と考えられる細菌系統も腸内から一定の割合で検出されたが、特に *Polaromonas* 属細菌種に関して、生息氷河表面試料と腸試料とでは優占する系統が異なることが判明した。これらの結果から、氷河カワゲラ腸内には、嫌気条件や栄養濃度、宿主免疫系などの点で生息氷河表面と異なる環境があり、そこに適応した動物腸内特異的な細菌種や氷河由来細菌種によって構成される、独特な細菌共生系が存在していると推察された。加えて、メタゲノム解析によって、例えば *Porphyromonadaceae* 科の細菌種は、主食の藻類に含まれる難分解性多糖の分解酵素遺伝子を豊富に有していることが判明し、宿主の栄養に寄与している可能性が示唆された。発表では、他の細菌種も含めたより詳細な解析結果を報告する予定である。

鈴木 優美^{1, 2}, 牧田 寛子², 光延 聖³, 大橋 優莉⁴, 高村 岳樹¹, 高井 研²
¹神奈工大・院工, ²JAMSTEC, ³愛媛大・農, ⁴静岡県大・院薬食

鉄は地殻の主構成金属元素であり、地球上に多量かつ普遍的に存在する。さらに、多くの生物にとって必須元素であり、生物に利用されやすいことから、有機物が乏しい深海では微生物にとって主要なエネルギー源の一つであると考えられる。しかし、これに反し生化学的性状が明らかになった深海性鉄利用微生物は僅かである。そこで、深海環境で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ために、深海底で種々の鉄鉱物(玄武岩、パイライト純鉄)のインキュベーション(現場培養)実験を行った。

一定期間後に回収した鉄鉱物試料のうちパイライト試料の微生物群集構造解析の結果、検出された微生物叢は周辺環境より採取した堆積物中の微生物叢と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。しかし、微生物叢の違いだけでは、検出された微生物種がエネルギー源としてパイライトを利用しているのか、付着しただけなのか判断できない。そこで、現場培養実験を行った環境からパイライトをエネルギー源として生育する微生物を単離することを目的とした培養実験を行った。

植種源として現場培養装置の設置地点である伊豆・小笠原弧ベヨネース海丘の熱水活動域、非熱水活動域の堆積物を使用した。培地としては、鉄酸化細菌の培養に用いられる海水培地に鉄源としてパイライトを添加し、N₂:CO₂混合ガスでパージしたものをを用いた。培養条件はベヨネース海丘の熱水活動域の堆積物より単離された深海性鉄酸化細菌 *Mariprofundus micogutta* の培養条件を参考にし、培養・植継を繰り返すことで単離を試みた。

この結果、非熱水活動域から採取した堆積物を植種源とした培養液からは *Aurantimonas* 属、熱水活動域から採取した堆積物を植種源とした培養液からは *Marinifilum* 属細菌の単離にそれぞれ成功した。また、鉄利用微生物を選択的に培養するために、培地に添加する鉄源をパイライトから塩化鉄に変えて培養した系では、単離には至らなかったものの活発な増殖が認められ、現在単離に向けて培養を進めている。本発表では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。

美野 さやか¹, 丸山 史人², 中川 聡^{3, 4}, 牧田 寛子⁴, 高井 研⁴, Stefan Sievert⁵, 澤辺 智雄¹
¹北大・院水, ²京大・院医, ³京大・院農, ⁴JAMSTEC, ⁵WHOI

深海底熱水活動域には、化学合成を行う微生物を一次生産者とする独自の生態系が育まれている。噴出熱水に含まれる無機化合物をエネルギー源とする化学合成独立栄養細菌のうち、*Epsilonproteobacteria*綱に属する細菌群は、世界各地の熱水噴出孔に優占するコスモポリタン微生物であることが知られている。これまでに我々は、世界各地の熱水活動域から

*Epsilonproteobacteria*綱 *Sulfurimonas*属を分離し、多遺伝子座配列解析（MLSA）法に基づく集団遺伝学的解析を行い、*Sulfurimonas*集団が海域間で異なる遺伝的特徴を有することを見出し、コスモポリタン微生物にも異所的種分化が生じることが示唆してきた。本解析から、沖縄トラフでは同一海域内に2つのクレードが認められたものの、MLSAのみでは、本クレードの遺伝的分化やその要因の解明は困難である。そこで本研究では、沖縄トラフから分離された株を対象に集団ゲノム解析を行い、2つのクレードにおけるゲノムレベルの相違点を明らかにするとともに、遺伝的分化をもたらす要因を推定することを目的とした。沖縄トラフの海域に位置する伊平屋北部海丘、伊是名海穴、鳩間海丘の熱水活動域から分離された *Sulfurimonas*属 44株を対象に、ドラフトゲノム（平均約2.2 Mb）の塩基配列を決定した。Average Nucleotide Identity算出の結果、各クレード内では95%より高い値を示したものの、クレード間での値は95%未満であった。また、1085 個のシングルコア遺伝子の塩基配列に基づく系統解析においても、同様のクレード形成が認められた。このことから、沖縄トラフ内にはクローナルでない *Sulfurimonas*集団が存在することが明らかとなった。また、パンゲノム解析の結果、いずれのクレードもオープンゲノムを有しており、外部環境からの頻繁な遺伝子獲得が生じていることが示唆された。本発表では、クレード間の相違点や同所的種分化の原動力について、集団遺伝学的観点を交えて議論したい。

黒澤 佳子, 黒沢 則夫

創価大学大学院 工学研究科 環境共生工学専攻

これまでに報告されている箱根大涌谷や霧島温泉などの温泉試料を用いた16S rDNAクローン解析法による原核生物の群集構造解析の結果から、温泉中にも多くの未培養アーキアやバクテリアが存在することがわかっている。長崎県雲仙市小浜町の“雲仙地獄”と呼ばれる噴気地帯にも、大小様々な熱水湧出池が多数存在する。基本的にはpH 2～5の硫酸酸性の硫黄泉であるが、泉温は50℃程度から95℃と幅広く、多様な好熱菌が生育していると推定される。本研究では、雲仙地獄から採取した温泉試料を用いて、出来るだけ多くの条件で好熱菌集積培養を行うことにより、新規好熱菌の分離を試みた。2016年11月に、雲仙地獄噴気地帯の5ヵ所の源泉（A：雀地獄81℃；pH 2.9、B：お糸地獄79℃；pH 2.9、C：八万地獄82℃；pH 1.9、D：大叫喚地獄95℃；pH 1.8、E：旧八万地獄70℃；pH 1.9）から表層堆積物を含む温泉水を採取した。それぞれの試料について、培養温度90、80、70℃、独立栄養条件と従属栄養条件、好気条件と嫌気条件を組み合わせた計12条件（5試料合計60系列）で集積培養を行った。培地pHは源泉試料のpHにそれぞれ合わせた。微生物の増殖が認められた集積培養液を、群集構造解析用と菌体保存用に分けていったん冷凍保存した。好気条件下での集積培養では、独立栄養条件14系列（70℃：5、80℃：5、90℃：4）、従属栄養条件7系列（70℃：2、80℃：4、90℃：1）において微生物の増殖が確認された。また嫌気条件下では、独立栄養条件2系列（70℃：2）、従属栄養条件4系列（70℃：3、80℃：1）において、微生物の増殖が確認された。これらの集積培養液から混合DNAを抽出し、原核生物16S rDNAユニバーサルプライマー（Pro340F-Pro805R）、アーキア16S rDNA特異的プライマー（A340F-A1000R）。バクテリア16S rDNA特異的プライマー（B27F-U1492R）を用いてPCR増幅を行った。良好な増幅が見られた試料について、集積培養液中の微生物群集構造解析を行った。本要旨の投稿時点で、お糸地獄から採取した試料を用いた嫌気性従属栄養条件の集積培養液中から、*Caldisphaera lagunensis*が検出されている。本種は、2003年に伊藤らにより記載された好酸性好熱クレンアーキオータで、フィリピン酸性温泉から分離された嫌気性従属栄養の球菌である。現在、微生物の増殖が認められた他の集積培養液中の微生物群集構造についても解析を進めている。

鹿島 裕之, 牧田 寛子, 山本 正浩, 高井 研
海洋研究開発機構

近年、細胞外の環境（鉱物・電極・共生関係にある他細胞など）から細胞内外電子移動によって電子を取り込み、生命活動を営む電気栄養微生物（Electrotroph）が報告されている。一方で自然環境の電気化学調査から、深海熱水噴出孔周辺では、導電性の硫化鉱物を介した海底下の還元的な熱水から酸化的な海水に向かう電子の流れが発生していること、そして電気栄養的な生命活動が存在する条件が整っていることが明らかになった（Yamamoto et al., 2017 ACIE）。このような背景から、著者らは深海底熱水活動域において電気栄養微生物の探索を行っている。本発表では、著者らが深海底熱水活動域より分離した単離株による電気栄養的な培養の検討結果について報告する。深海底熱水活動域に生息する独立栄養性鉄酸化細菌は、二価鉄イオンを外膜表面で酸化し、得られた電子を細胞内の呼吸鎖に引き入れると報告されているが、これは細胞外の還元力を電子の形で細胞内に移動させる点において、電気栄養的代謝に必要な電子取り込みと同様だと考えられる。そこで、この鉄酸化機構を持つ微生物の一部は、二価鉄イオン以外の細胞外の固体電子供与体から電子を取り込む電気栄養的な代謝を行う可能性があると考えた。この仮説を検証するため、深海底熱水活動域から分離した独立栄養性鉄酸化細菌 *Mariprofundus micogutta* ET2株を用い、還元的な電位を印加した電極を細胞外電子供与体、酸素を電子受容体、無機炭酸を炭素源とした独立栄養的な電気培養実験を行った。水酸化鉄(III)を生じる二価鉄イオンの酸化反応に準じた電位を印加した電極において、安定したカソード電流（すなわち還元的電極から引き抜かれる電子のフラックス）が確認され、顕微鏡観察から細胞集団の電極表面への活着が確認された。このことは、当該電極表面において細胞集団が関与した電子引き抜き反応が行われたことを示唆している。さらに、電極からの電子供給を続けた細胞集団と、電子供給を停止し電子飢餓状態を再現した細胞集団との比較から、電極表面の細胞集団は電極からの電子供給により代謝活性を維持していたことが示唆された。これら一連の結果を電気栄養的な生命活動の兆候を捉えたものと位置づけ、現在更なる検討を行っている。

花田 祐一¹, 石井 俊一², Ana Z. Miller³, José M. Marques³, Kenneth H. Nealson⁴, 鈴木 志野⁵

¹株式会社マリン・ワーク・ジャパン, ²海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター, ³Instituto Superior Técnico, University of Lisbon, ⁴Department of Earth Science, University of Southern California, ⁵海洋研究開発機構・高知コア研究所

上部マントル起源の超塩基性岩（カンラン岩）が隆起している場所では、カンラン岩が地球表面の水と反応し、蛇紋岩に変質する。この岩と水との反応過程（蛇紋岩化作用）で水素、メタン、カルシウムイオン、および水酸化物イオンなどが生成され、遊離・放出される。そのため、この反応が活発に起きている水圏は、自然界で最もpHが高く（ $\text{pH} > 11.5$ ）、非常に還元的という特徴をもつ。一方、深部蛇紋岩流体が地表に近づき、徐々に表層大気の影響を受け始めると、ごく微量の酸素分子が電子受容体として利用可能になるため、深部蛇紋岩流体に比べて細胞数が著しく増大することが確認されている。これまで研究されてきた好アルカリ性微生物は、至適pHをpH 9-10に持ち、高ナトリウムイオン条件下を好むものが多い。一方、この蛇紋岩深部流体と表層大気との境界部に形成される超アルカリ性の生命圏では、微生物の生命維持がより一層困難であると考えられる。その理由としては、1) この水系の主要な陽イオンはカルシウムであるため、プロトンのみならず、ナトリウムイオンの駆動力を用いたエネルギー代謝を行うことが困難であると推測されること、2) pH 10以上の環境では細胞内pHの維持が極めて困難なこと、3) 炭酸水素イオンやリン酸イオンがカルシウムイオンと反応して不溶化し、利用困難な状態にあること、などが挙げられる。そこで我々は、これまでに微生物叢解析により様々な陸上の蛇紋岩水系に多く存在することが確認されている微生物群をターゲットとして、Cabeço de Vide（ポルトガル）、およびThe Cedars（米国）の2つの異なる蛇紋岩水系から微生物の分離・培養を行った。その結果、Alpha-、Beta-、Gammaproteobacteria、Deinococci、Bacilliなどに属する微生物群が単離され、それらはpH 11以上で良好に生育する微生物群であることが分かった。さらに、それらの微生物の生理性状解析やゲノム解析の結果から、超アルカリ性微生物は蛇紋岩水系に特有の環境に適した生存戦略を獲得していることが示唆された。以上の結果から、蛇紋岩深部流体と表層大気の境界部には、pH 11以上を至適とする未知の超アルカリ生命圏が存在することが示唆された。

The lipids of the bathyal *Calyptogena* clam (*Calyptogena fausta*), which house chemosynthetic symbionts in the gill filaments, assimilate unusual n-4 family (n-1/n-4/n-7) long-chain non-methylene interrupted polyunsaturated fatty acids (NMI-PUFA). Similar to the fatty acid composition of lipids 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. Differed from high levels of n-3 PUFA in the surface clams, 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 *C. phaseoliformis*, the two bathyal *Calyptogena* clams (*C. fausta* and *C. octanii*) ranging at about 1,000m depths have 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.

Nanako Kanno, Sakiko Nagashima, Vera Thiel, Satoshi Hanada
Tokyo Metropolitan Univ.

At Nakabusa hot spring, Japan, olive-green microbial mats dominated by the filamentous anoxygenic phototroph *Chloroflexus aggregans* develop in alkaline hot spring water around 65°C. Although *C. aggregans* appears to represent a primary producer in these mats and its genome contains the complete set of genes for carbon fixation via the 3-OH-propionate pathway, the ability to grow autotrophically has not been demonstrated for this species. So far only two strains in this genus, i.e., *C. aurantiacus* OK-70-fl and *Chloroflexus* sp. MS-G, have been reported on their autotrophic growth. In this study, we isolated autotrophic *C. aggregans* strains and investigated the autotrophic growth characteristics.

Olive-green mats collected in Nakabusa hot spring were enriched in a minimal medium containing 50 mM HCO₃⁻ and 0.3 mM S²⁻ with illumination at 55°C. Filamentous bacterial strains showing photoautotrophy have newly been isolated. Of these isolates, an autotrophic strain, designated ACA-12, showed 98.7% nt identity to *C. aggregans* MD-66^T. The strain showed autotrophic growth in liquid media in addition of sulfide.

In this presentation, we will discuss the ability of carbon fixation of newly isolated strain in *C. aggregans* together with related *Chloroflexus* strains recently isolated from hot springs of Yellowstone National Park, USA.

塩谷 泰生¹, 佐藤 和叶¹, 美野 さやか¹, Stefan Sievert², 澤辺 智雄¹
¹北大・院水, ²WHOI

深海底熱水活動域には、熱水中に含まれる無機化合物をエネルギー源とする化学合成独立栄養細菌に立脚した化学合成生態系が育まれている。化学合成独立栄養細菌の中でも、Epsilonproteobacteria綱に属する微生物群は、世界各地の深海底熱水活動域において、普遍的に優占することが知られている。Epsilonproteobacteriaは現場の物質循環において重要な役割を担うため、本分類群の網羅的な分離培養が行われ、その生理特性や多様性の理解が深まりつつある。さらに、近年、それらの比較ゲノム解析に基づき、本分類群の再編も議論されはじめた。しかし、好熱性Epsilonproteobacteriaに関する知見は未だ乏しく、これらの分離培養およびその生理生態学的特徴の解明が必須であり、それがより確かな分類体系の構築にも資する。そこで、本研究では、東太平洋中央海膨のチムニー片から好熱性Epsilonproteobacteriaを分離し、生理学および分子系統学的特徴を明らかにすることを目的とした。2014年11月に、WHOIが実施した東太平洋中央海膨におけるAT26-23調査航海で採取したBio9 熱水噴出孔由来チムニー片から、限界希釈法によりグラム陰性の運動性を持つ好熱性短桿菌を分離した。分離培養には、人工海水に元素状硫黄、チオ硫酸、硝酸、水素/二酸化炭素の混合ガスを加えた無機培地を用いた。本分離株は、その16S rRNA遺伝子情報から、Nitratiruptor属に近縁であるものの新規性が高いことが示唆された。また、本分離株の最適増殖温度・pH・塩分濃度、利用可能なエネルギー基質の組み合わせ、炭素源、窒素源および抗生物質耐性などの生理学的特徴を明らかにした。本発表では、本分離株の生理学的特徴を報告するとともに、ゲノム情報に基づく分類学的知見およびその新規性について議論したい。

Detection of new members of *Chloracidobacterium* in hot spring microbial mats from Bulgaria and Japan

Yoshiki Shirotori¹, Satoshi Hanada¹, Michal Koblížek², Donald A Bryant^{3, 4}, Marcus Tank¹
¹Tokyo Metropolitan Univ., ²Center Algatech, ³Pennsylvania State Univ., ⁴Montana State Univ.

Chloracidobacterium thermophilum is the first and sole phototrophic species in the phylum Acidobacteria which was isolated from cyanobacterial dominated microbial mats in alkaline hot springs in Yellowstone National Park, and has been validly described in 2015. *C. thermophilum* grows photoheterotrophically at 51 ° C and requires micro oxic conditions, bicarbonate, L-branched chain amino acids and L-lysine as well as vitamin B12 and reduced sulfur sources.

In the search for new members of *Chloracidobacterium* microbial mat samples from alkaline hot springs in Nakabusa (Nagano prefecture, Japan) and in Rupite (Bulgaria) were microscopically and molecular biologically analyzed and isolation approaches were conducted.

New members of *Chloracidobacterium* were detected in both hot springs. The microscopic analyzes showed the typical rod shape cell morphology as for the type strain with a cell size ~ 1 x 2.5 µm. Bacteriochlorophyll a and c were detected with epifluorescence microscopy using specific filters sets for bacteriochlorophyll autofluorescence 16S rRNA gene sequence analysis using *Chloracidobacterium* specific primers indicated new species of *Chloracidobacterium* in Japan and Bulgaria with 16S rRNA identities of 97% to the type strain. Stable enrichment cultures of new members of *Chloracidobacterium* have been established and isolation approaches for axenic cultures are in progress.

清水 拓真¹, 下川 賢大¹, 岡井 公彦¹, 浦野 直人¹, 関口 峻允^{1,2}, 能木 裕一², 加藤 千明², 石田 真巳¹
¹東京海洋大学, ²国立研究開発法人 海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

【背景・目的】本研究室では、好圧性・耐圧性の新規リパーゼの探索、解析及び利用を目指し、相模トラフ（深度500m、4.4℃）から好冷菌*Moritella* sp. F1株及びF3株を単離した。F1株の精製リパーゼ（以下、F1-Lip II）は50MPaで最大活性を示す好圧性酵素である一方、F3株の精製リパーゼは好圧性を示さず、構造機能相関上、興味深かった。F1-Lip IIの一次構造は*M. marina* ATCC 15381全ゲノム配列上のhypothetical proteinと高い相同性があったが、既知リパーゼとの共通モチーフ等はなく、新規酵素の可能性が示された。本研究では、F1株とF3株の詳細な種同定を行って既知*Moritella*種との関係を明確にすること、また、F1-Lip IIを大腸菌の系を用いた組換え体で生産させることを目的とした。

【方法】F1株とF3株の分類同定は、16SrRNA遺伝子配列の相同値が最も高かった*M. marina*、*M. profunda*を対照としてDNA-DNA hybridizationを行った。加えて、脂肪酸組成、糖の資化性等を分析した。遺伝子クローニングは、F1-lipIIコード領域の両端のDNAプライマーを用いてF1株DNAからPCR介在法によって行った。PCR産物を発現ベクターpLEAD5（ニッポンジーン）に連結し、*E. coli* JM109に導入してYT+Ap培地で培養した。酵素活性は、*p*-nitrophenyl laurate（C12）を基質としAbs 410nmの変化を追跡して行った。

【結果・考察】F1株とF3株の分類同定： DNA-DNA hybridizationから、F1・F3株は既知*Moritella*種との相同性が60%以下で、これらとは別種であることが示された。また、F1とF3の株間の相同性は90%以上で、同種であることが示された。糖の資化性試験から、F1およびF3株は、対照種*M. marina*および*M. profunda*と異なり、多くの糖に対して資化能を有した。以上の結果から、F1・F3株は*Moritella*属の新種と判断された。組換え体による酵素生産： 培養温度を37℃から15℃まで変えた結果、37℃で可溶性画分に最も高いリパーゼ活性50Unit/L（常圧）が示された。IPTG濃度や誘導開始時間には大きな影響はなかった。

木暮 梨花¹, 清水 拓真¹, 岡井 公彦¹, 浦野 直人¹, 加藤 千明², 石田 真巳¹¹東京海洋大学, ²国立研究開発法人 海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

【目的】本研究室では、相模トラフ（深度500m、4.4℃）からリパーゼ生産好冷菌 *Moritella* spp. F1株及びF3株を単離した。両株の16SrRNA遺伝子配列は100%一致した。しかし、F1株から単離したリパーゼ（以下、F1 lip II）は50 MPaで最大活性を示す好圧性酵素だったが、F3株から単離したリパーゼ（以下、F3 lip II）は大気圧で最大活性を示す非好圧性酵素であった。これまで報告されていない新規な酵素の好圧性の分子機構解明のために、F1 lip II とF3 lip II の構造と機能の比較が有効であると期待される。一次構造や性質の解析が先行している好圧性のF1 lip II に対して、本研究では、非好圧性のF3 lip II の塩基配列決定、組換え体での酵素生産などを行い、両酵素の性質を比較することを目的とした。

【方法】*Moritella* sp. F3 DNAのF3 lip II コード領域をPCRで増幅し、In-Fusionクローニング法によりpLEAD5ベクターと相同塩基配列を連結させ、*E. coli* JM109に導入した。組換えプラスミドを抽出して本遺伝子コード領域を配列決定した。分子モデリングはSWISS-MODELにて実施した。目的遺伝子をもつ組換え大腸菌をYT+Ap培地で培養し、IPTGによる転写誘導条件等を検討した。菌体を超音波破碎して粗酵素液を得、加圧下での分解活性を測定した。

【結果及び考察】F3 lip II 遺伝子をクローン化した組換えプラスミドpLEAD5-F3 lip II を作成した。コード領域（全2,370 bp）の塩基配列をF1 lip II （2,370 bp）と比較したところ、3塩基のみ（F1 lip II の1140 T、1150 A、1159 AがF3 lip II では各々C、T、C）が異なっていた。演繹アミノ酸は2残基が異なり（1残基は同義置換）、F1 lip II のAsn384とThr387がF3 lip II ではTyr384とPro387に置換されていた。F3 lip II の演繹アミノ酸配列から分子モデリングを試みたが、相同性は11.49%（外膜タンパク質ToIC）しか得られず、立体構造は不明だった。組換え体での生産効率が低かったが、組換えF3 lip II は非好圧性であり、F1 lip II との違いは上の2アミノ酸残基置換に規定されるものと推定される。

鈴木 匠爾, 黒沢 則夫
創価大・工学院

超好熱菌は高温環境に適応するために、独自の適応メカニズムを有していると考えられる。現在知られている超好熱菌は“リバースジャイレース (RG)”というDNAをきつく巻く酵素を共通して持っている。RGの細胞内機能を明らかにすることは、超好熱性細胞の仕組みをより理解するためにとっても重要である。RGは高温下でのDNAの安定化に寄与する。一方Napoliらは、UV照射後に細胞質中のRGの大部分がゲノムDNAへ移動することを発見し、RGが超好熱菌のUV応答に関与しているという仮説を提唱した。しかしながら、この仮説を実証した研究例はこれまでにない。本研究では、RGのUV応答への関与を実証するために、好熱性クレナーキア *Sulfolobus acidocaldarius* がもつ2つのRG: TopR1とTopR2の遺伝子破壊株を作製し、そのUV感受性を調べた。

TopR1は全ての超好熱菌に普遍的に存在し、TopR2はThermoproteales目を除く(超)好熱性クレナーキアだけに見いだされている。ポップアウトを用いた遺伝子破壊法により、2つのRG遺伝子 (*topR1* または *topR2*) 領域に欠失を導入した。*topR1* の破壊には、制限酵素 *SuaI* を破壊したウラシル要求性変異株SK-1 ($\Delta pyrE \Delta suaI$) を用い、*topR2* の破壊には、SK-1株のDNAフォトリナーゼを破壊したDP-1株 ($\Delta pyrE \Delta suaI \Delta phr$) を用いた。RG破壊株のUV感受性は、UV照射後の液体培地での生育を比較することで調べた。

topR2 破壊株 {DP-3 ($\Delta pyrE \Delta suaI \Delta phr \Delta topR2$) } は構築できたが、*topR1* 破壊株は得られなかった。しかしながら、*topR1* の発現量に影響が見られていると予想される中間体株 {TRCM-1 ($\Delta pyrE \Delta suaI topR1::pyrE-lacS$) } が得られたため、*topR2* 破壊株とともにUV感受性を調べた。UV照射後の生育を比較すると、DP-3およびTRCM-1株ともに、野生株に比べて増殖が確認されるまでにより長い時間を要し、UV照射に感受性を示した。この結果は、TopR1とTopR2のいずれも、好熱性クレナーキア *S. acidocaldarius* のUV応答に関与していることを強く示唆している。

泊口 菜月¹, 玉腰 雅忠², 玉木 秀幸³, 宮崎 健太郎^{3, 4}¹東洋大・生命科学, ²東薬大・生命科学, ³産総研・生物プロセス, ⁴東京大・新領域

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分子である。特にその構造骨格である16S及び23S rRNAは、多くの因子と緊密に相互作用するため極めて保守性が高く、水平伝播などの劇的な遺伝的变化は受け付けないと考えられてきた。16S rRNAの遺伝子配列が進化系統解析の分子マーカーとなっているのも、こうした「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、綱（Kitahara et al., 2012）や門（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明らかにした。本研究では、16S rRNAの種間和合性を高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において検証した。

検証手順としては、以下である。

1. *T. thermophilus* HB27ゲノム内に2コピー含まれる16S rRNA遺伝子（rrsA及びrrsB）の内、一方(rrsB)を完全欠失した変異株（DB1）を作製した。
 2. もう一方の16S rRNA遺伝子(rrsA)を、ゲノム内相同組換えにより異種16S rRNA遺伝子と置換することを試みた。
- 手順2において、16S rRNA遺伝子の下流にハイグロマイシン耐性遺伝子を配置し、この耐性株として得た置換変異候補株の16S rRNA遺伝子の塩基配列を解析して置換の有無を確認した。

外来16S rRNA遺伝子の供給源としてはDeinococcus-Thermus門に属する種々のバクテリア16S rRNA遺伝子を用いたが、その種によって異なる結果が得られた。まず、*T. thermophilus*と同属の*T. Brockianus*、*T. kawayensis*、*T. scotoductus*、*T. aquaticus* 16S rRNA遺伝子により生育相補を試みたところ、70°Cでのスクリーニングで全長遺伝子の置換株が得られた。次に、*T. thermophilus*とは属レベルで異なる*Meiothermus ruber*及び目レベルで異なる*Deinococcus radiodurans* 16S rRNA遺伝子により同様の実験を行ったが、置換変異株は得られなかった。我々は、*M. ruber*は中等度好熱菌、*D. radiodurans*は常温菌であることから、機能相補しなかった一因は16S rRNAの耐熱性の欠如にあると考えた。そこで、スクリーニング温度を*T. thermophilus*の生育下限温度である50°Cに下げたところ、共に全長及び種々のキメラ体が得られた。また、*D. radiodurans*と同属であるが、15°C程度高い温度で生育する*D. geothermalis*についても実験を行なったところ、65°Cでのスクリーニングで全長遺伝子の置換株が得られた。

Mia Terashima, Kazuhiro Umezawa, Hisaya Kojima, Shoichi Mori, Manabu Fukui
Hokkaido University, Institute of Low Temperature Science

Psychrophilic microalgae blooms that color the snow surface green and pink can be observed during the spring snowmelt season of polar and alpine environments. These microalgae have a vegetative growth phase followed by cyst formation and dormancy. Heterotrophic bacteria are also abundantly found in colored snow and interact intimately with algae. Algae photosynthetically fix and excrete carbon, supporting bacteria growth, while bacteria recycle elements back into the environment and may provide algae with crucial nutrients. The interactions between snow algae and bacteria are not well characterized. In order to further understand the community dynamics of snow algae and bacteria, colored snow samples from Mt. Asahi (Hokkaido) were collected to conduct physicochemical, community sequencing and culture-based analyses. Both vegetative (green) and resting (red) algal snow patches were observed. Upon collection and analysis of these samples, we identified the dominant algae to be *Chloromonas* spp. However, there were differences in the photosynthetic activity and bacterial community profile between the green and red snow, suggesting a possible link between the algal metabolic state and the bacterial community. Sequencing results in addition to findings from laboratory cultures of vegetative snow algal strains and its growth-promoting bacteria will be presented.

川本 純¹, Chen Chen¹, 横山 文秋¹, 河合 総一郎¹, 今井 友也², 栗原 達夫¹¹京都大学化学研究所, ²京都大学生存圏研究所

細菌が生産する菌体外膜小胞 (Outer-membrane vesicle, OMV) は、膜に覆われた 20 nm から 3000 nm の球状の小胞で、核酸やタンパク質、脂質、代謝物といった様々な生体分子を内包している。OMV の生産はこれまでに単離されている全ての細菌で確認されており、細菌間コミュニケーションもしくは細菌-宿主間コミュニケーションのツールとして機能し、バイオフィルム形成や病原性の発現といった様々な生理機能を制御していると考えられている。グラム陰性細菌の場合、OMV は外膜が出芽することで OMV が形成されるモデルが提唱されているが、この課程で特定のタンパク質や脂質分子が OMV 選択的に輸送されることで、細胞とは異なる組成で形成されている。本研究では、グラム陰性細菌の OMV 生産を利用した低温での膜タンパク質生産の開発を目的とし、回遊性魚類の腸管から 4 °C で秀でた OMV 生産能を有する低温菌 *Shewanella* sp. HM13 を獲得した。本菌の培養液から培養上清を調製し、透過型電子顕微鏡および脂溶性蛍光色素をもちいて膜OMV 生産能を解析した結果、本菌は約 100 nm の OMV を生産していた。さらに、本菌由来の OMV を密度勾配遠心に供した後、各画分を SDS-PAGE を用いて OMV 関連タンパク質を解析した結果、HM13 の OMV には約 49 kD のタンパク質 (P49) が単一タンパク質として含まれていたことから、本菌は OMV を介して P49 を菌体外に分泌生産する仕組みを有していることが示された。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 は 1,422 bp の遺伝子でコードされる膜局在性のタンパク質であり、機能未知タンパク質であった。P49 遺伝子を含む遺伝子クラスターには II 型タンパク質分泌装置関連タンパク質が存在したことから、これらの分泌装置関連遺伝子の破壊による OMV 生産への影響を解析した。その結果、II 型タンパク質分泌装置関連タンパク質遺伝子破壊株は野生株と同様の OMV 生産能を有していたのに対して、本遺伝子破壊株の OMV に組み込まれる P49 は顕著に低下していた。以上の結果は、本菌の OMV を介した P49 選択的な膜タンパク質分泌生産は、II 型タンパク質輸送装置によって制御されている一方で、OMV 生産は P49 の輸送とは独立した経路で進行することが示唆された。

栗山 知子¹, 上村 真由子¹, 丸山 温¹, 小松 雅史², 山口 宗義²¹日大・森林資源, ²森林総研

森林における有機物分解は、物質・エネルギー循環や生物多様性といった森林生態系の機能を支える重要な過程である。有機物分解時に行われる微生物呼吸は、周囲の環境要因（温度、含水比）や有機物の基質要因（物理性、化学成分）、腐朽段階などにより影響を受けることが知られている。しかし、有機物分解において主な役割を担っている分解者微生物のバイオマス量と分解呼吸速度との関係を示した研究はほとんどない。そこで本研究では木材腐朽菌に着目し、栽培方法が確立されているシイタケをモデルケースとして、シイタケを植菌した木材の菌体バイオマスと分解呼吸速度について調べることを目的とした。まず、シイタケに種特異的なプライマーを開発し、定量PCR法を用いてシイタケ菌体バイオマスを定量する手法を開発した。次に、シイタケの室内培養実験と野外栽培実験を行った。室内培養実験では、シイタケ種駒（森290号）をコナラ木片に植菌し、102日間室内培養を行った。週に1度の頻度で赤外線ガスアナライザーを用いて木片の分解呼吸速度を測定した後、木片から得た木粉中のシイタケ菌体バイオマスを定量PCR法を用いて定量した。その結果から、培養初期である植菌開始から約40日間はシイタケ菌体バイオマスの増加とともに分解呼吸速度が増加していることがわかった。培養後期には、コナラ木片に環境ストレス（高温40℃, 4時間・湛水常温, 4時間・乾燥ストレス常温, 3日間）を与え、シイタケ菌体バイオマスの定量と分解呼吸速度の測定を行った。野外栽培実験では、シイタケ種駒を植菌したコナラのホダ木を野外で栽培し、月に1度の頻度で赤外線ガスアナライザーを用いてホダ木の分解呼吸速度を測定した。さらに同時期に植菌した別のホダ木から得た木粉中のシイタケ菌体バイオマスを定量PCR法を用いて定量した。さらには、室内培養実験と野外栽培実験で得られた木粉中中の真菌とバクテリアのDNAコピー数を定量した。分解者である微生物のバイオマスと分解呼吸速度の関係について、これらの実験から得られた結果を報告する。

大園 享司¹, 保原 達², 菱沼 卓也³, 東 順一³¹同志社大学理工学部, ²酪農学園大学, ³京都大学大学院農学研究科

Fruiting bodies of *Clitocybe* sp. were encountered in association with partly decomposed litter materials that were bleached due to colonization by mycelia of this fungus. We clarified the impact of this fungus on the chemical and fungal properties of litter materials and quantitatively evaluated the potential ability of this fungus to cause selective decomposition of lignin. The content of lignin was lower, and the contents of soluble carbohydrates and nutrients and net mineralization rate of N were higher in bleached litter materials (BLM) than in adjacent nonbleached litter materials (NBL). Total hyphal length was 5.4 times greater in BLM than in NBL. A total of 49 fungal taxa were isolated, 30 from BLM and 42 from NBL. In pure culture decomposition tests, *Clitocybe* sp. caused greater mass loss in partly decomposed leaves than in freshly fallen leaves, which was attributed to the greater mass loss of lignin and more selective decomposition of lignin in partly decomposed leaves. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy showed that *Clitocybe* sp. was responsible for the selective transformation of the chemical structure of lignin. These results showed that *Clitocybe* sp. had a marked ability to remove lignin selectively from partly decomposed leaves and to enhance N mineralization, contributing to small-scale heterogeneity of the decomposition within the forest floor.

松岡 俊将¹, 佐藤 博俊², 原田 憲³, 片野 泉⁴, 土居 秀幸¹¹兵庫県立大・シミュレーション, ²龍谷大・理工, ³兵庫県立大・環境人間, ⁴奈良女子大・理

菌類は、有機物の分解、生きた動植物との共生・寄生といった生活を通じ、森林生態系においてユニークな機能を担っている。これまで、森林における菌類相評価は、主に土壌や植物組織を対象として行われており、森林中の菌類は高い種多様性を持つこと、菌類種組成は植生の違いに大きく影響を受けることなどが確かめられてきた。しかし、一般に土壌中では菌類種組成の空間的異質性が高く、景観スケール(〜数キロメートル)での菌類多様性を推定するためには、空間構造を考慮した多量のサンプルを解析する必要があった。一方近年、森林内を流れる河川水中には、水中で生活する菌類に加えて、周囲の陸域に生息する菌類の遺伝子が含まれうることがわかってきた。これは、河川水を解析対象とすることで、集水域の菌類相情報を得られる可能性を示している。そこで本研究では、河川水を対象とした菌類メタバーコーディングを行うことで、河川水中にどのような菌類が含まれているのか、そして菌類相は周囲(集水域)の環境を反映しているのかを調査することを目的とした。サンプリングは、2015年の5月、9月、10月に兵庫県西部にある揖保川上流域で行った。異なる支流を含む計19点(約10km以内)において、川の中心部から1Lの水を採集した。採集した水についてMiSeqを用いた菌類メタバーコーディングによりサンプル中に存在する菌類DNAの検出を行った。全19サンプルから合計で696 OTU(操作的分類群)が検出された。このうち最も多様な菌群は子囊菌類であり、281 OTUが検出された。サンプル当たりのOTU数は 126 ± 37 OTU(平均 $\pm$ SD)で、OTU数と植生、空間距離との関係は検出されなかった。機能群を推定で来た120 OTUのうち、水生菌類は24 OTU、陸生菌類は96 OTUであった。このうち水生菌類では分解菌、陸生菌類では内生菌や病原菌など植物関連菌が主要な機能群であった。OTU組成は、サンプル採集場所の空間距離が近いほど似ていた。このOTU組成の構造は、空間距離によって有意に説明されたが、集水域の植生では有意には説明されなかった。これらの結果は、河川水中の菌類相を調べることで、陸域の菌類相情報も得られる可能性を示している。今後は、水中と陸域の菌類相比較や、菌類相と環境要因との影響について検討を進める必要がある。

樹木の根には菌根菌が共生し、宿主の成長を支えている。この菌根菌の周りには多様な細菌が生息し、菌糸成長や菌根の形成量に影響を与えることが分かってきた。本研究ではキツネタケをモデル材料とし、菌根の表面および根の内部の細菌フロラをDNA解析によって明らかにした。山梨県シミック薬用植物園のクリ園において、キツネタケの子実体が発生していた5地点から土壌コアを採取し、キツネタケの菌根を50根端取り出した。5根端ずつ1.5mlマイクロチューブに入れて、1mlの滅菌蒸留水で約3分間ボルテックスし、菌根の表面を洗浄した。この洗浄作業を7回繰り返した。最後に50根端を一つにまとめて、市販のキットによりDNAを抽出した。プライマー8fおよび1223rで得られた16SrDNA領域のPCR反応物を用いてクローニングを行った。プライマーM13fおよびM13rを用いて大腸菌コロニーからダイレクトPCRを行った。プライマー515fを用いてシーケンス解析を行い、V3、V4領域の塩基配列から分類属性を推定した。キツネタケ以外で多く見られた菌根（*Cenococcum geophilum*、未同定種2種）についても同様の解析を行った。99%以上の相同性に基づいたグルーピングにより、キツネタケ菌根及びその他の菌根から得られた塩基配列は、それぞれ83、65の分子操作的分類群（MOTU）に分かれた。MOTU数で多く占めていたのはProteobacteria門（83MOTU）であった。キツネタケ菌根及びその他の菌根から共通して検出されたMOTU数は23で、*Bradyrhizobium*属1系統とGammaproteobacteria綱の1系統が全ての地点で検出された。その他のMOTUは検出頻度が低かった。Non Metric Multidimensional Scalingによる解析では、菌種間で細菌群集のフロラに明確な違いは見られなかった。*Bradyrhizobium*属1系統については、同調査地で行われた分離培養試験においても、全ての地点のキツネタケの菌根から多く分離されている。よって、キツネタケ菌根の周辺にはProteobacteria門を代表とする多様な細菌が生息し、なかでも*Bradyrhizobium*属が普遍的に存在していると考えられた。

杉山 賢子, 村田 政穂, 奈良 一秀
東大 新領域

ヤクタネゴヨウ(*Pinus amamiana*)は屋久島と種子島のみに分布する、日本固有のマツ科植物である。本種は絶滅危惧種に指定されており現在もその個体数が減少していることから、保全のために植栽された人工林が屋久島内に3ヶ所存在する。これらの人工林はヤクタネゴヨウの自生地から離れた場所に造成され、菌根菌の導入も行われていないため、自生地とは異なる菌根菌群集が形成されている可能性がある。特に、ヤクタネゴヨウと特異的に共生する*Rhizopogon* sp. (以下、ヤクタネショウロ)は自生地で優占し、実生の更新に重要な役割を果たしていることから、ヤクタネゴヨウと一体的な保全が望ましいと考えられるが、人工林での生息状況は不明である。そこで本研究では、ヤクタネゴヨウ人工林の菌根菌群集を調べ、ヤクタネショウロのような自生地の菌種が人工林においてどの程度保全されているのかを明らかにすることを目的とした。ヤクタネゴヨウ人工林3ヶ所から71の土壌サンプルを採取し、含まれていた菌根のDNA解析によって菌種を同定した。その結果、合計72種の菌根菌が確認されたが、自生地と共通する菌種は*Cenococcum geophilum*のただ1種のみであり、ヤクタネショウロは3ヶ所いずれの人工林においても検出されなかった。一方、人工林で優占していた菌種はハツタケ(*Lactarius hatsudake*)であったが、この種は天然林においては検出されていない。これらの結果から、造成されたヤクタネゴヨウ人工林では自生地と全く異なる菌根菌群集が形成されており、自生地の菌根菌を保全する場としては機能していないことが明らかとなった。

升屋 勇人¹, 菊地 泰生², 市原 優³, 相川 拓也¹¹森林総研・東北, ²宮崎大・医, ³森林総研・関西

スギ黒点病菌 *Sydowia japonica* はスギ雄花に特異的に感染する寄生菌であり、スギ花粉飛散防止のための生物農薬としての開発が進められている。一方で、この菌の散布による環境への影響評価はまだ十分には行われていない。実用化に際しては特に環境への影響評価は重要である。そこで本研究では土壌菌類群集構造への影響について調査した。岩手県盛岡市の樹齢約50年のスギ人工林の林縁1m²に、*S. japonica* 孢子懸濁液1Lを散布した。また、対照区として約100年生アカマツ天然林、およびスギ人工林付近で、それぞれ1m²の非散布区を設定した。各区でA0層を除去し、ランダムに20mlの土壌を10地点から、約2週間ごとに1年間、28回採取した。採取土はサンプルごとに混和、攪拌後、500mgずつ、3本のチューブに移し、FastDNA spin kit for soilで抽出を行った。得られたDNAを鋳型に、ITS 1領域をターゲットにしたバーコード付きのIllumina用アダプタープライマーでPCR増幅を行った。PCRは3反復行ったあと混合、電気泳動により分離、精製し、Illumina Miseqを用いて解析した。得られたデータはQIIMEで解析した。その結果約885万リードが得られた。すべてのリードをランダムに10000リードまでサンプリングし直して α 多様性を計算して作成した希薄化曲線では、対照区間で種数に大きな違いは見られなかったが、散布区でやや種数の減少が見られた。主座標分析では各区は異なるクラスターを形成し、各区で種構成が異なると考えられた。散布区では12月末まで*S. japonica*が検出されたが、以降頻度は減少し、未検出となった。全体的に比較的高い頻度で出現したのは *Mortierella* と未同定子嚢菌、および *Archaeorhizomyces* であった。*Archaeorhizomyces* はマツ林で6月に最大33%の頻度で検出された。菌類の多様性の季節性については十分な解像度は得られなかったが、冬期では両区で *Archaeorhizomyces* の頻度はやや低下する傾向にあった。また、夏期に対照区で未同定子嚢菌の頻度がやや上昇したのに対し、*Mortierella* では逆の傾向にあった。ただし、散布区とマツ林内ではこうした傾向は認められなかった。結論として散布の影響は少ないと考えられた。

佐藤 優平¹, 立石 貴浩², 小藤田 久義², 石川 奈緒³, 颯田 尚哉², 築城 幹典²¹岩手大学大学院総合科学研究科, ²岩手大学農学部, ³岩手大学理工学部

2011年3月の東京電力福島第一発電所事故により、大量の放射性核種が大気中に放出された。特に放射性Csの放出量は多く、生態系への長期的な影響が懸念されている。6年経過した現在では、農耕地や牧草地において約9割の除染が完了したが、森林においては、面積が広大であるなどの理由から除染が遅れている。森林土壌の除染を目的とした堆積腐植層の除去は森林生態系にとって大きな攪乱となるため、攪乱を伴わない新しい除染法が求められている。そこで、本研究では、Cs吸収効率が高い菌類を接種したおがくず資材による森林土壌中のCsの回収の可能性について検討を行った。【方法】供試試料として、岩手大学農学部滝沢演習林のコナラ林、スギ林、アカマツ林の堆積腐植層（以下A₀層）を用いた。供試菌株は担子菌類の*Favolus arcularius* NBRC4959、*Lentinus edodes* NBRC4902、*Pleurotus ostreatus* NBRC30776、*Flammulina velutipes* NBRC30600 子囊菌類の*Xylaria* sp. NBRC107815を用いた。室内実験として、安定Csを添加した各A₀層試料を300mlビーカーに入れ、その上に供試菌株を事前に接種したおがくず資材を充填したナイロンメッシュバッグを置き、暗所25℃で約1か月間培養した。さらに、滝沢演習林において、室内実験をスケールアップしたものを実施した。菌を接種したおがくず資材と各A₀層試料を充填した8号ポット（Ø27cm×22cm）を演習林林床に39日間放置した。回収後の資材及びA₀層試料中のCs含有量はICP-MSで分析した。また、A₀層試料中の菌糸バイオマス量は直接検鏡法により、微生物バイオマスCsはクロロホルム燻蒸-抽出法により測定した。【結果】室内実験では、A₀層試料からおがくず資材にCsの移行が確認され、そのCs移行率は接種した菌類やA₀層試料の種類によって大きく異なっていた。特に、*F. arcularius*や*L. edodes*などは、Csの資材への移行が高い傾向にあった。コナラのA₀層試料中では、菌糸バイオマス量が大きくなると資材へのCsの移行が増加する傾向がみられた。一方、室内実験をスケールアップした森林林床での実験では、必ずしも室内実験で得られた結果と一致しなかった。これは森林林床での設置が地温の低下する秋季で行われたことや1か月という短い放置期間であったことによるためと考えられた。今後は長期間での野外実験を行い、本法の妥当性を検討する必要がある。

古澤 仁美¹, 木下 晃彦¹, 仲野 翔太¹, 野口 享太郎², 小長谷 啓介¹, 山中 高史¹

¹森林総合研究所, ²森林総合研究所・東北支所

国内産セイヨウシヨウロ属 (*Tuber* spp.) の人工栽培を検討するにあたり、基礎的知見として子実体発生地の環境条件を明らかにする必要がある。そこで黒トリュフ (*Tuber* sp. 6; Kinoshita et al. 2011, Mycologia 103, 779–794) および白トリュフ (ホンセイヨウシヨウロ: *T. japonicum*) の発生地において土壌環境の調査を行った。*Tuber* sp. 6については昨年の日本菌学会大会で報告した山梨県、京都府、岡山県 (2サイト) の計4サイトに加えて兵庫県で調査を追加した。ホンセイヨウシヨウロについては岡山県、栃木県、三重県、大阪府の計4サイトで調査を行った。各サイトにおいて、子実体の発生地と、発生地と隣接する対照地 (子実体の発生が確認されない場所) で、表層土壌を採取して土壌の物理・化学的特性や微生物特性を測定した。0-5cm深さの土壌において、土壌pHは*Tuber* sp. 6では5.9~8.0の範囲にあり、ホンセイヨウシヨウロでは6.2以下であった。土壌pHについて子実体の発生地の方が対照地より高い傾向があるサイトもあったものの、全9サイトをまとめてサイトと子実体有無の影響を2元配置分散分析で検討したところ、サイトの影響が有意であり ($p<0.0001$)、子実体の有無では有意差は認められなかった。電気伝導度 (EC) については、*Tuber* sp. 6では1.5~14.2 ms/mの範囲にあり、ホンセイヨウシヨウロでは1.5~3.4ms/mの範囲にあった。ECについても、サイトと子実体有無の2元配置分散分析ではサイトのみ有意であった ($p<0.0001$)。ヨーロッパで栽培されている *T. melanosporum* についてはpH 7以上のアルカリ性の土壌を好むと言われていた。これに対し今回調査した *Tuber* sp. 6とホンセイヨウシヨウロでは中性から弱酸性環境に生息していると考えられた。発表ではこの他の土壌の化学的特性や微生物特性についても結果を示し、*Tuber* sp. 6とホンセイヨウシヨウロの好適環境について考察する。

執行 宣彦¹, 平尾 聡秀¹, 梅木 清²¹東大・秩父演習林, ²千葉大・院園芸

森林植生は、野生動物による食害から、台風攪乱、気候変動、環境汚染などの人為的要因に至るまで、さまざまな影響を受けている。こうした影響は、土壌微生物群集の機能や復元性（resilience）を改変し、森林生態系の物質循環を簡単に変える可能性があることが指摘されている。そのため、土壌細菌群集の機能と復元性に対する植生の影響を理解することは、将来の森林の役割を維持する上で重要である。植物が多様な形質の落葉や種特異的な根分泌物を土壌に供給することを考えると、植生の変化に伴って土壌微生物群集は機能的に異なった種で構成されている可能性がある。本研究では、森林の下層植生の被度や多様性が高いほど土壌細菌の機能的多様性が高く、出現の少ない下層植物をもつ調査地ほど土壌細菌群集の機能的冗長性が低いという仮説を立て、土壌細菌群集の機能と復元性を規定する要因を明らかにすることを目的とした。東京大学秩父演習林の冷温帯天然林において、標高傾度（900-1800 m）に沿った60ヶ所の調査区を設置し、土壌採取と植生調査を行った。2014年5月下旬から6月上旬に、深度ごと（0-5・5-10・10-20・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と群集の系統樹に基づいた予測メタゲノム解析を行った。これらのデータから、土壌細菌の機能遺伝子の相対遺伝子量・機能的多様性・機能的冗長性を算出した。下層植生の調査として、調査区あたり5つのコドラート（1 × 1 m）を設置し、ササ類と高さ30 cm以下の維管束植物の種の同定と被度の測定を行った。林床ではササ類が優占しており、標高の上昇に伴い下層植生の種数と被度は増加した。代謝に関わる機能遺伝子量は樹木の胸高断面積合計と相関がなかったが、下層植生の被度と有意な正の相関を示した。一方で、下層植生の被度の増加に伴い、土壌細菌のOTUと機能遺伝子の多様性は減少する傾向を示した。また、ササ類のスズタケ（*Sasa borealis*）が出現する調査地は、出現しない調査地に比べ、土壌細菌群集の機能的冗長性は低下する傾向があった。このことから、ササ類優占の有無などの下層植生の違いは土壌細菌群集の機能や復元性に影響を及ぼしていることが考えられる。

橋本 靖, 平野 春花
帯広畜産大・環境農学

トドマツの落葉を対象に、森林における冬期積雪下での菌類による落葉の分解過程を明らかにすることを目的として、積雪下のトドマツ落葉に定着している菌の種構成を調べ、その菌の分解能力を実験的に明らかにした。2013年～2015年の間、帯広市の2カ所のトドマツ林内に、トドマツ落葉を入れたリターバックを埋設し、翌年の2月～4月と7月にこれらを回収した。さらに、カラマツ林内にもトドマツ葉を埋設し、また、トドマツ林内には γ 線滅菌した落葉も埋設し回収した。回収したトドマツ落葉は、表面を滅菌処理してから葉内に定着している菌類を培養検出し、培養形態とDNAの解析により種を同定した。さらに、落葉から検出された菌株を用いて、滅菌した落葉への接種試験を行った。その結果、3年間にわたって回収した落葉からは、全部で845菌株が分離された。トドマツ林内で積雪期に回収した落葉で多く検出されたのは、*Phacidium grevilleae*、*Sydowia polyspora*、*Pezicula* sp.の3種と見られる菌で、これらは樹木の葉に定着する内生菌や病原菌として報告されている種であった。これら3種の積雪期の優占菌は、カラマツ林内に埋設して回収したトドマツ落葉でも出現率が高く、特に*P. grevilleae*は、冬期だけでなく4月と7月に回収した落葉からも高頻度で出現した。一方で、この3種の積雪期優占菌は、埋設前のトドマツ落葉試料からも優占して検出された一方、滅菌処理を施してから埋めた落葉からは検出されなかった。そのため、これらの優占菌は、土壌から落葉に入るのではなく、枝についている段階からすでに定着していると考えられた。この積雪下の優占菌3種の菌株の、落葉への接種実験の結果、培養温度3℃条件下での落葉重量減少は、*P. grevilleae*は約7%、*S. polyspora*は約3～5%、*Pezicula* sp.は約5%と、低温下でも一定量が分解された。以上から、トドマツ林内において、落葉前から葉に定着している菌が、葉が地上に落ちた後も定着し続けて、冬期積雪下での落葉分解の初期段階に貢献していることが示唆された。

Helbert Helbert¹, Misa Itoh¹, Yoshie Terashima², Kazuhide Nara¹

¹Dept. of Natural Environmental Studies, The University of Tokyo, ²Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus

Pinus luchuensis is endemic to Ryukyu Islands, while the pine wilt disease has been devastating the pine forests in some islands. The survival and regeneration of the pine would depend on ectomycorrhizal (ECM) fungi, yet we know very little about the diversity and composition of ECM fungi associated with Okinawa pine. We collected about 50 soil samples in each pine forests on Okinawa, Amami, Iriomote and Ishigaki. Collected ECM root tips were morphotyped and subjected to molecular identification. Host tree species of each ECM root tips was also identified. We found 101 fungal Operational Taxonomic Unit (OTUs), most of them were confirmed on Okinawa Pine roots, yet 56 were only associated with broadleaf trees, especially in Amami Island where pine wilt disease was severe the sampling time. ECM fungal communities were dominated by common and species-rich family such as Russulaceae, Sebacinaceae, and Thelephoraceae. Species richness was comparable among the islands, i.e. 31, 47, 32, and 43 OTUs on Okinawa, Amami, Iriomote and Ishigaki, respectively. NMDS analysis found that ECM fungal community on Amami was significantly different from other islands. Because considerable numbers of OTUs were shared between the islands, even between the Middle Ryukyu and South Ryukyu separated by Kerama Gap, spore dispersal of ECM fungi may not be so restricted by sea at this geographical scale.

若菜 大悟¹, 武田 尚¹, 細江 智夫¹, 山岡 裕一², 岡根 泉², 出川 洋介², 阿部 淳一², 細矢 剛³, 升屋 勇人⁴
¹星薬大, ²筑波大, ³国立科学博物館, ⁴森林総研

[目的]トネリコ属は主に北半球の温帯地域に分布する落葉樹であり、その堅い木質から、木材として用いられる重要な樹木である。近年、ヨーロッパを中心にトネリコ属植物に対する病害 Ash dieback が猛威を振るっており、その原因菌は *H. fraxineus* とされている。一方、日本ではトネリコ属植物の葉軸上で *H. fraxineus* の子実体が形成されるにもかかわらず、Ash dieback 様の病徴は確認されていない。この二つの地域における病徴の違いは、病原菌に対する植物の抵抗性、あるいは、菌株による病原力の違い等による理由が考えられる。本病害の病原力は、2010 年に Andersson らにより本菌が産生する viridiol にあることが報告されたが、2014 年に Junker らが、無毒株である *H. albidus* が viridiol を産生すること、これらの菌の培養エキスによる病徴が viridiol 含有量と相関しないことを報告しており、Ash dieback と viridiol の関係は明確になっていない。そこで、Ash dieback と viridiol の関係を解明する情報収集の 1 つとして、国内で採集された *H. fraxineus* の viridiol 産生能について分析調査した。[方法] *H. fraxineus* 9 菌株を、米固体培地を用い、25℃で 2 ヶ月培養した。培養後メタノールで抽出し、得られた抽出エキスを酢酸エチルで液液分配した。これらの酢酸エチル分配エキスを ODS カラムを用いた DAD-HPLC で分析した。[結果] HPLC 分析の結果、*H. fraxineus* 9 菌株全てに viridiol の産生が確認された。また viridiol と同様の UV 吸収パターンを持つ物質が複数確認された。[結論] 今回の使用菌株はヤチダモに対し Ash dieback 様の病徴を示さないに関わらず、全て viridiol を産生した。また、*H. fraxineus* の子実体が観測されたヤチダモ落枝の抽出エキスからも viridiol が検出しているため、自然環境中においても viridiol は産生されていると考えられる。そのため、viridiol が Ash dieback の病徴に対する主要因ではない可能性が示唆された。

中村 慎崇, 田中 千尋, 竹内 祐子
京都大・院農

樹木の根は土壤中で幅広い生態的スペクトルをもった菌類と相互作用を持つ。なかでも、ブナ科樹木の根部からは、ピョウタケ目（子囊菌門）に属する特定の系統（以下、本系統）が分離培養並びに分子生物学的手法によって高頻度で検出されることが明らかとなっている。既知のピョウタケ目根部内生系状菌の中には、有性世代が知られておらず、分生子形成の条件が限定的であるものが知られており、その分散方法についてはこれまで議論がなされてきた。本系統においても同様に有性世代が見つかっておらず、子実体を形成しない、あるいは形成が稀であるため発見が困難であると考えられる。かつて、微生物群集を決定する要因は環境による選択のみであると考えられてきたが、近年では構成する種の分散能力の制限により、歴史的経緯等が微生物群集の決定に寄与していることを示唆する知見が得られている。すなわち、土壤微生物においても分散能力は群集構造を決定づける重要な要素の一つである可能性がある。本研究では、根に定着し本系統に属するピョウタケ目菌の一種（*Helotiales* sp. 3）に着目し、京都市内から分離・収集した菌株を用いて有性生殖のプロセスの存在を示す組み換えの検出と集団構造の解析を行った。高台寺山、吉田山のツブラジイが優占する林分ならびに衣笠山、吉田山のコナラが優占する林分で土壌サンプルを採集した。細根を洗浄、表面殺菌し、菌叢形態とITS領域の塩基配列に基づいて*Helotiales* sp. 3の菌株を識別し、収集した。得られた菌株は、抑制PCR法で開発した6遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いた解析に供した。その結果、遺伝子座間での有意な連鎖は認められず（ $p > 0.05$ ）、*Helotiales* sp. 3における有性生殖的機構の存在が示唆された。また、採集地点間の集団の分化の程度を示す F_{ST} は-0.034から0.122となり、採集地点間の組み合わせにより緩やかな分化が見られた。一方、同一採集地点（吉田山）における異なる林分間の F_{ST} は-0.094となり、集団の分化はほとんど見られなかった。これらの結果から、*Helotiales* sp. 3集団への林分構成種の影響は小さく、分散能力は限定的であることが示唆された。

木原 久美子^{1,2}, 中川 喬文¹, 山田 明徳³, 吉村 剛⁴¹熊本高専・生物化学システム工学科, ²理研・CSRC, ³長崎大学・水産環境科学, ⁴京大・生存圏

シロアリは枯死材に侵入し木材を分解するが、どんな材にでも侵入する訳ではない。木材は、構造・含有水分量・硬度・他生物侵入の違いにより材質が様ではなく、同一樹種でもシロアリの侵入の有無には差異がある。本研究の長期的目的は、シロアリの木材への侵入部位は侵入していない部位と比べてどのような特徴があるか？という問いに答えることであり、木材への腐朽菌侵入とシロアリの侵入の関係解析に向けた複数の試行実験により、木材腐朽菌とシロアリの相互作用を検証することを目指している。ここでは、木材又はその構成成分であるセルロースによるモデル丸太系を解析サンプルとし、この腐朽初期段階に対するシロアリの挙動について議論する。シロアリによる食害活性が極めて高い野外試験地に設置したサンプルは、シロアリの活動域に棲息する複数の環境微生物による複合的な腐朽を受ける。木材サンプルの腐朽状態を定量化し、主成分分析やクラスター解析を行ったところ、同一期間にわたり同一試験地内で野外に暴露したサンプルであっても異なる腐朽状態に至ることが観測された。木材の構造的複雑性の影響が系を複雑にしている事が考えられたため、これを排除したより単純な系としてセルロースだけから構成されるモデル丸太系サンプルも同様に腐朽実験を行った。これらをシロアリに供与し、シロアリによる消化量を定量化することで、腐朽初期段階におけるシロアリの餌としての嗜好性を調べた。腐朽を受けたサンプルと、未腐朽のサンプルでは、未腐朽サンプルよりも腐朽サンプルでシロアリによる嚙り取りや穿孔が活発である傾向が見られた。腐朽サンプルのうちシロアリが「削る部位」と「食べる部位」に分けて観測出来れば、シロアリの木材消化に関係するシロアリ体外の環境微生物種の特定や腐朽システムの理解に繋がる。そこで、シロアリが好んで食べる腐朽状態を反映する値として、摂食排出活動量を糞数によって定量化することを試みた。この方法は、摂食度合いを示す値として有効な手段と考えられた。腐朽とシロアリの相互作用関係を調べるため、サンプルの物理的状態測定や定着菌種の同定により、シロアリ活動に影響する腐朽の特徴付けをさらに進める。

砂川 政英¹, 平出 政和¹, 森下 敏和², 大橋 洋二³

¹森林総研, ²農研機構, ³栃木県林業センター

2011年3月に発生した東京電力福島第一原子力発電所の事故により環境中へ多量の放射性ヨウ素¹³¹I、放射性セシウム¹³⁴Csおよび¹³⁷Csが放出され、関東・東北地方のきのこの栽培用おが粉および原木は、それらの放射性物質により汚染された。菌床培地で発生したきのこの放射能が、食品に含まれる放射性セシウムの規制値（100Bq/kg、湿重量）以下となる栽培技術および新品種の開発が求められている。そのため本研究では、ヒラタケにガンマ線を照射して突然変異を誘発させ、放射性セシウムを吸収しにくいようなヒラタケの作出を行った。

東 智則¹, 米山 彰造¹, 佐藤 真由美¹, 浦木 奈美², 松本 晃幸²¹道総研・林産試, ²鳥取大・農学部

高い抗酸化機能を有するアミノ酸の一種であるエルゴチオネイン (EGT) が、きのこ類の優れた健康機能成分のひとつとして注目されている。中でもヒラタケ属のタモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*) は、他のきのこ種よりも高いEGT含量を示すことが知られている。演者らはこの特徴に着目し、本菌の食品としての付加価値を高めることを目的として、TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法を用いた突然変異育種によるEGT高含量株の育成に着手した。今回は、まず標的とするEGT生合成遺伝子を決定し、本菌のUV照射突然変異体集団についてTILLINGを実施したので報告する。供試菌株には、北海道立総合研究機構林産試験場保存のタモギタケ二核菌糸HfpriPc05-1株（野生型）とその構成一核菌糸Y1、Y2株、およびPc05-1株のUV照射突然変異体約3,000株1)を用いた。標的遺伝子を決定するため、*Mycobacterium*属細菌で報告されている4つのEGT生合成関連遺伝子とアカパンカビ (*Neurospora crassa*)で報告されているNcEgt-1 (NCU04343)を対象とし、それらのタモギタケY1 株ゲノム上の相同領域を抽出し、当該領域のcDNA配列を用いて子実体における発現解析を行った。その結果、NcEgt-1 ホモログ領域はNcEgt-1と相同なドメイン構造を有し、他のホモログ領域より大幅に高い発現量を示した。また、栄養菌糸体および子実体発育段階別の発現量の変動は、成熟子実体で高くなるEGT含量の変動傾向と一致した。以上より、NcEgt-1ホモログ領域はアカパンカビと同様に本菌でもEGT生合成との関わりが強いと推察され、本研究ではNcEgt-1ホモログ領域を標的としてTILLINGを実施した。TILLINGは供試変異体集団のDNAをバルク化した突然変異体プールから標的遺伝子領域（3269bp）における突然変異体を探索した。その結果、29株における変異保有を特定した。現在、各変異体における変異様式について解析を進めている。なお本研究は平成27年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業で実施した。1)米山ら、日本きのこ学会誌、Vol.23(1) 20-25 (2015)

戸部 隆太¹, 名田 イサナ¹, 田島 寛隆¹, 広瀬 有², 今井 友也³, Prakash Tejo N. ⁴, 三原 久明¹
¹立命大・生命, ²豊橋技科大・環境生命工学, ³京都大・生存研, ⁴Thapar Univ.・Sch. Energ. Environ

【背景・目的】 第16族（カルコゲン）に属するセレン（Se）とテルル（Te）は、その半導性から先端産業分野では欠かせない元素である。しかし、それぞれのオキシアニオン（亜セレン酸・セレン酸・亜テルル酸・テルル酸）は有毒性があり、工場排水や土壌への流出により環境汚染の要因の1つとなっている。これまでにSe オキシアニオンを元素状 Se に還元する酵素は複数報告されているが、その反応機構については明らかにされていない。さらに、亜テルル酸還元に関わる酵素はいくつか報告されている一方で、テルル酸の還元はモリブドプテリンの関与が示唆されているのみである。本研究では、高濃度セレン地帯の土壌から単離された *Cellulomonas* sp. D3a株のユニークなカルコゲンオキシアニオン還元能に注目し、その還元特性を明らかにすることを目的とした。【結果・考察】 好気・嫌気両条件下における *Cellulomonas* sp. D3a 株のオキシアニオン還元能を調べた。各オキシアニオン存在下で本菌を培養した結果、本菌は好気・嫌気両条件下においてテルル酸を還元することを見出した。これまでに好気下でテルル酸を還元できる細菌はほとんど報告されていない。一方で、嫌気下においては亜セレン酸還元能を示すが、好気下では亜セレン酸毒性により著しい生育阻害が起こることが明らかとなった。また、亜セレン酸およびテルル酸の還元により生じた元素状 Se・Te の細胞内外の蓄積を走査型電子顕微鏡および透過電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、亜セレン酸の還元に伴い菌体表面にSe 粒子とみられる物質が観察された。テルル酸の還元では、菌体表面には Te 粒子は観察できず、500 nm を超える針状のテルル粒子とみられる物質が細胞を貫く状態で観察された。さらに、ゲノム解析により、D3a 株におけるカルコゲンオキシアニオン還元酵素の推定を試みた。得られたD3a 株のゲノム配列に対して、BLAST 検索を行った結果、テルル酸を除くカルコゲンオキシアニオンの還元酵素としてこれまでに報告されているタンパク質のホモログが複数見出された。一方、テルル酸還元にはモリブデンの関与が示唆されてきたが、本菌のゲノム上には、モリブドプテリン生合成系の酵素群が存在しなかった。これらのことより、本菌がこれまでに報告されていない新奇なテルル酸還元系を有することが示唆された。

葛野 侑香¹, 生田 帆河¹, 西田 亮¹, 戸部 隆太¹, 広瀬 侑², Prakash Tejo N. ³, 三原 久明¹

¹立命大・生命, ²豊橋技科大・環境生命工学, ³Thapar Univ.・Sch. Energ. Environ.

【目的】 テルルは、周期表の16族（カルコゲン）に属し、半導性を有することから化学工業やナノテクノロジーなどの産業分野では欠かせない元素である。一方で、水溶性のテルルオキシアニオン（テルル酸や亜テルル酸）は、生体毒性が高く、工業排水中に含まれることで環境汚染の一因となる。そこで、特殊な微生物を用いて有毒オキシアニオンを毒性の低い不溶性元素態に還元し、回収する研究が注目されている。しかし、細菌におけるテルル酸還元酵素に関する報告は、大腸菌の変異株を用いた解析により、モリブデン含有酵素の関与が示唆されているのみである。実際に、テルル酸還元酵素やその還元メカニズムは未だ明らかにされていない。我々はこれまでに、テルル酸還元細菌として *Bacillus* sp. NTP-1 株を単離し、全ゲノム配列を解読した。さらに、テルル酸を基質とした活性染色により、本菌が複数のテルル酸還元酵素を有することを明らかにした。本研究では、ゲノム情報を基に本菌のテルル酸還元酵素を特定し、その機能の解明を目指した。【結果】 16S rRNA 解析の結果より、NTP-1 株は *B. pumillus* の近縁種であることが示された。そこで、NTP-1 株のテルル酸耐性能および還元能を *B. pumillus* および同属の *B. subtilis* と比較した。その結果、NTP-1 株は他菌より高いテルル酸耐性能を有することが示され、本菌が特殊なテルル酸還元代謝機構をもつことが示唆された。NTP-1 株のテルル酸還元酵素を特定するために NTP-1 株のゲノムに対し、既知のカルコゲンオキシアニオン還元酵素のホモログ検索を行った。その結果、本菌のゲノム上にテルル酸還元酵素の候補遺伝子として *Bnt_2015* を見出した。本遺伝子産物のモチーフ検索を行ったところ、本タンパク質は鉄硫黄クラスターおよびモリブデンを補因子とすることが示唆された。*Bnt_2015* のテルル酸還元活性を調べるために、*Bnt_2015* を大腸菌発現用ベクターにクローニングし、テルル酸還元能が低下した大腸菌変異株を用いた相補実験を行った。テルル酸還元活性は、テルル酸の還元に伴う元素状テルル（黒色沈殿）の生成を定性的、および定量的に評価した。その結果、*Bnt_2015* を導入した変異株において、野生株と同程度のテルル酸還元能が認められ、本遺伝子産物がテルル酸還元酵素として機能することが示唆された。

前島 由明¹, 村口 雄亮¹, 森内 良太², 道羅 道夫², 金原 和秀¹, 新谷 政己¹¹静大院・総合科技, ²静大・グリーン研

【背景と目的】静岡県浜松市に位置する佐鳴湖は滞留時間の長い汽水湖であり、COD値が高いという特徴がある。先行研究では、本湖から採取した湖水を、孔径0.22 µmのメンブレンフィルターを通過させた後に培養することで、16S rRNAレベルにおいて新奇性の高い複数菌株の分離培養に成功した。本研究では、それらのうち、*Spirobacillus*属細菌として初めて分離培養された *Spirobacillus* sp. RF1110005 (=JCM 31447) の全ゲノム配列を決定し、その特徴を調べることを目的とした。【方法】

RF1110005株のDNA配列はMiseq (Illumina) にてペアエンド法により解読し、SPAdesおよびNewblerを用いてアセンブルした。GenoFinisher, AceFileViewer, GenomeMatcher^{1) 2)}を用いてfinishingを行い、PCRとサンガーシーケンスによってgap closingした。得られた全塩基配列に対し、DFAST (<https://dfast.nig.ac.jp>) を用いてアノテーションを行った。

【結果と考察】RF1110005株は、1つの染色体 (3.52 Mb, GC含量33.7%)、2つのプラスミド (pRF1110005S : 68.8 kb, pRF1110005L : 79.5 kb) を有していた。染色体上には3031個のCDSと10のrRNA、43のtRNAが、pRF1110005S上には68 CDS、pRF1110005L上には80のCDSが見出された。染色体上にはoxygenaseをコードする遺伝子が15個存在しており、その中の5つの遺伝子が芳香族化合物の開裂に関与すると推定された遺伝子であった。この5つの遺伝子をNCBIのBLASTにより、タンパク質の相同性を調査したところ、同定されているタンパク質との相同性が40-57%と低い相同性を示した。現在、どのような芳香族化合物を生育基質にできるかについて調べている。今後は、oxygenaseを中心に従来の分解菌との比較ゲノム解析を行い、新奇な点を明らかにする。1) Ohtsubo *et al.*, *BMC Bioinformatics*.2008, 16:376. 2) Ohtsubo *et al.*, *J Bacteriol.* 2012, 194:6970

小林 裕樹^{1, 2}, 前田 太郎^{1, 2}, 山口 勝司³, 亀岡 啓^{1, 2}, 田中 幸子^{1, 2}, 江沢 辰広⁴, 重信 秀治^{3, 5}, 川口 正代司^{1, 2, 5}
¹基生研・共生システム, ²JST ACCEL, ³基生研・機能解析セ, ⁴北大・農, ⁵総研大

多くの植物は、土壌中の糸状菌類と菌根を形成する。一般的に菌根共生とは、植物が光合成で獲得した炭素栄養と菌類が土壌から吸収した無機栄養を交換する相利共生を意味し、大半の陸上植物にみられる共生関係である。その中でもアーバスキュラー菌根(AM)は、陸上植物の出現当初から存在していたことが知られており、植物と微生物の相互作用の中でも最も普遍的なものの一つである。しかし、共生菌であるAM菌は絶対共生性であり単独培養が困難であること、多核共存体であり遺伝学解析が難しいことなどから、その研究は他の生物と比較して遅れている。これまでに得られているゲノム情報は、モデル種である*Rhizophagus irregularis*に限られているため、AM菌を特徴付ける絶対共生性や植物への定着、栄養交換の分子機構などに対して比較ゲノム解析を通じたアプローチができない。そこで我々は、*R. irregularis*と同様に世界中分布し、特に酸性土壌から頻繁に分離される*R. clarus*のHR1株(MAFF520076, 愛知県幡豆町由来)の全ゲノム解析を開始した。ゲノム解読にはショートリードシーケンサーIllumina HiSeq1500およびロングリードシーケンサーPacBio RSIIを使用し、約52Gbのショートリードデータおよび26Gbのロングリードデータを得た。これらのシーケンス結果からゲノムサイズは約146Mbpと推定され、アセンブルにより総塩基数116.5Mbp、N50 = 59.93 kbpのドラフトゲノム情報が得られた。現在、このゲノム情報を基にモデル系統*R. irregularis* DAOM197198株との比較ゲノム解析を行っており、AM菌の絶対共生性の要因となっている遺伝的背景や、共生関係の構築に関わる遺伝子に関する解析を実施している。また、耐酸性の違いなどAM菌株間の生理活性の差異を与える遺伝的要因等についても調査し、報告する予定である。

Felipe Vejarano¹, Chiho Suzuki-Minakuchi¹, Yoshiyuki Ohtsubo², Masataka Tsuda², Kazunori Okada¹, Hideaki Nojiri¹

¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, ²Department of Environmental Life Sciences, Tohoku University

Carbazole, a mutagenic and carcinogenic heteroaromatic, is released to the environment by usage of fossil fuel or derived products. Diverse carbazole degradative (car) gene clusters have been found in various bacteria, being either chromosomally or plasmid-encoded. To understand the role of insertion sequences (IS) in the recruitment of the different types of car gene clusters to different strains, we aimed to complete the genome sequences of representative carbazole degraders. We previously presented draft genomes of 32 carbazole degraders from diverse environments, assembled automatically from the short reads of Illumina and 454 sequencers. In this study, nine strains were chosen as representatives of the different types of car gene clusters and their genomes were re-sequenced by constructing Illumina's PCR-free and mate-pair libraries, and manual finishing was conducted using GenoFinisher and AceFileViewer software. The complete genome sequences of eight representative strains were determined. Previously identified candidate genes for unreported components of the initial dioxygenase and a CoA-ligase for an alternative anthranilate degradation route in marine isolates were found to be chromosomally encoded. Furthermore, diverse IS families were identified in the vicinities of car gene clusters, which might reflect environmental differences of the strains isolation sources.

Natural rubber is an important material for production of industrial materials. However, the waste of these products has been treated by combustion or landfill processes, which are hazardous to the environment. Microbial degradation of rubber is expected to be a potential approach for solution of the environmental problem and reutilization of the rubber waste. *Nocardia* sp. NVL3 is able to utilize deproteinised natural rubber (DPNR) and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene) (SR). The genome analysis revealed that NVL3 has a unique latex clearing protein gene (*lcp*). Heterologous expression of *lcp* in *E. coli* showed that the *lcp* gene product (Lcp) is involved in the depolymerization of rubber and the production of compounds including aldehyde group by the addition of oxygen molecule. To characterize the oxidoreductase gene (*oxil*) which is located in the vicinity of *lcp*, the gene product was purified. When the purified Oxil was added to DPNR overlay plate after the reaction of Lcp, depletion of the aldehyde compounds was observed. It is suggested that Oxil is responsible for the transformation of the aldehyde intermediates in the utilization of rubber in NVL3. The quantitative RT-PCR analysis revealed that the transcription of *lcp* and *oxil* was induced when NVL3 was incubated with SR. These results strongly suggested that these genes are responsible for the utilization of rubber in NVL3.

藤原 秀彦¹, 中尾 桜¹, 東 沙紀¹, 末永 光², 木村 信忠³, 渡邊 崇人⁴, 廣瀬 遵⁵, 二神 泰基⁶, 後藤 正利⁷, 古川 謙介¹
¹別府大・食物, ²産総研・創薬基盤, ³産総研・生物プロセス, ⁴京大・生存研, ⁵宮崎大・工, ⁶鹿大・能, ⁷佐賀大・農

【目的】 *Pseudomonas putida* KF715 株は、ビフェニル/PCB 代謝に関わる遺伝子群 (*bph*)、サリチル酸代謝に関わる遺伝子群 (*sal*) を有しているが、その形質は不安定である。これまでの研究により、本菌株は接合伝達により他菌株に *bph/sal* 遺伝子群 (*bph-sal* element) を高頻度に供与する能力を有していること、さらに、栄養培地で培養すると容易にビフェニル/サリチル酸分解能が消失した株が高頻度に出現することを明らかにしている。これらの現象は KF715 株のゲノム構造の柔軟性に起因するものであり、*bph-sal* element のみの欠失や転移にとどまらないダイナミックなゲノム構造の再編成の生起が確認されている。本研究では、これらの表現型の変遷をゲノム構造から明らかにするために、はじめに KF715 野生株の完全長ゲノム配列を決定した。次いで、*bph-sal* element を欠失した株や element が転移した株、安定なゲノム構造を持つ *P. putida* 菌株群との比較ゲノム解析を行うことにより、KF715 株が持つゲノム柔軟性の遺伝的要因を解明した。【結果】 ゲノム配列解析の結果、KF715 株は 1 つの環状染色体と 4 つのプラスミド (pKF715A, pKF715B, pKF715C, pKF715D) を有し、*bph-sal* element は pKF715A 上に存在していることが明らかとなった。周辺領域の遺伝子配列とサザンハイブリダイゼーションの結果より、pKF715A は Integrative and Conjugative Element (ICE) の環状中間体がプラスミドとして安定に存在しているものであり、一方で attB 部位を標的にして pKF715A が再び染色体上に組み込まれている個体も混在していた。また、pKF715A は接合伝達により AC30 株、さらに KT2440 株に転移した後も、染色体上に組み込まれることなく安定にプラスミドとして存在し、典型的な ICE とは異なる挙動を示した。続いて全ゲノム配列が決定されている他の *P. putida* 株と配列を比較した結果、KF715 株に Integrase や IS、Retron 等の特徴的な遺伝子群が確認され、これらの遺伝因子が KF715 株の柔軟なゲノム構造に寄与していることが推察された。

Allan Arciaga Devanadera¹, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI¹, Yuki KASAI², Yoh TAKAHATA³, Kazunori OKADA¹, Hideaki NOJIRI¹

¹The Univ. of Tokyo, ²Chuo Univ., ³Taisei Corp.

Azoarcus sp. DN11, a denitrifying bacterium, has been shown to be capable of degrading benzene, toluene, benzoate, but not phenol, under both aerobic and anaerobic conditions. However, its metabolic pathways for aerobic and anaerobic benzene degradation have not yet been clarified. Three initiating pathways have been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol and carboxylation to benzoate. Aerobic benzene degraders use monooxygenase or dioxygenase to initially hydroxylate the benzene ring to form catechol which will be metabolized through TCA cycle. This study aims to analyze the transcriptome of *Azoarcus* sp. DN11 during benzene degradation using RT-PCR and RNA-seq. RT-PCR results suggest that DN11 follows toluene and/or benzoate, but not phenol, pathways in degrading benzene under anaerobic conditions. On the other hand, DN11 could possibly use both monooxygenase and dioxygenase to degrade benzene aerobically according to RT-PCR results. Currently, RNA-seq raw data are being preprocessed to check the quality before proceeding to downstream analyses. Transcriptome characterization and gene expression quantification can then be determined to elucidate the anaerobic benzene pathway of *Azoarcus* sp. DN11.

山本 夏実, 高比良 早紀, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
東京大・生物工学セ

【背景・目的】プラスミドは難分解性物質分解能等の新規形質を宿主に付与するが、新規に獲得した遺伝子の発現は宿主ごとに異なる。これは、宿主染色体由来の因子がプラスミド上の遺伝子の転写に影響するためだと考えられる。更に、クローン集団中で同一遺伝子の発現が一細胞レベルで異なる例が報告されたことから、分解プラスミドが接合伝達により分解菌集団を形成する際、宿主の違いと細胞ごとの遺伝子発現の揺らぎが集団としての分解力を特徴付けると考えられる。そこで本研究では *Pseudomonas* 属細菌を宿主として pCAR1 上のカルバゾール分解系遺伝子群の発現を一細胞レベルで解析し、宿主ごとに比較することを目的とした。pCAR1 上のカルバゾール分解系遺伝子群は、カルバゾールを代謝する *car* オペロン、カルバゾール分解の過程で生じるアントラニル酸を代謝する *ant* オペロン、両オペロンの転写制御因子をコードする *antR* から成る。本研究では、*ant* オペロン、*car* オペロンの転写を誘導する P_{ant} 、*car* オペロンの転写を誘導する P_{carAa} 、*antR* の転写を誘導する P_{antR} という3つのプロモーターに着目した。

【方法・結果】プロモーターの下流に *gfph* が結合した遺伝子カセットを作製し、これをミニトランスポゾン Tn AT を用いて *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1) 株、*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1(pCAR1) 株、及び pCAR1 保持株である *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の染色体上の特異的な部位に挿入し解析用の菌株を作製した。アントラニル酸存在下で誘導される P_{ant} については、アントラニル酸を添加したコハク酸培地での緑色蛍光強度を経時的に測定した結果、3株共にアントラニル酸濃度に応じて誘導のかかり方に差が見られた。*P. resinovorans* CA10 株ではばらつきが小さいのに対し、*P. putida* KT2440(pCAR1) 株と *P. fluorescens* Pf0-1(pCAR1) 株では誘導の過程で一部の細胞が低い蛍光を示し、集団中に P_{ant} からの発現が強い細胞と弱い細胞が存在する可能性が示唆された。そこで蛍光強度の低い細胞をセルソーターを用いて分取したところ、*P. fluorescens* Pf0-1(pCAR1) 株においては pCAR1 の相同組み換えによる *antR* の欠失が起これ、 P_{ant} からの転写が誘導されにくくなることが一因であることが示された。 P_{carAa} 、 P_{antR} については転写量が小さいためか蛍光は検出されなかった。今後 P_{carAa} 、 P_{antR} からの発現を検出する系の構築を進め、発現の揺らぎを解析する予定である。

森内 良太^{1,2}, 道羅 英夫¹, 小川 直人^{2,3}¹ 静大・グリーン研, ² 岐阜大院・連合農, ³ 静大院・農

Cupriavidus necator NH9株は、芳香族塩素化合物である3-クロロ安息香酸（3-CB）を炭素源、エネルギー源として利用可能な土壌細菌である。3-CBは3-クロロカテコールに変換された後、*cbn*遺伝子群にコードされるクロロカテコールオルソ開裂経路の分解酵素群により、完全分解される。*cbn*遺伝子群の転写調節を担うCbnRは、細菌の転写調節因子群で最も大きなファミリーであるLysR型転写調節因子（LTTR）ファミリーに属している。しかし、1つの細菌内で多くのLTTRがどのように各被制御プロモーターを識別して制御するのか、全く未知である。そこでNH9株のLTTRネットワークについて調べ、3-CB分解について転写調節レベルの知見を取得することを目的とし、まずは全ゲノム配列の決定とトランスクリプトーム解析を行った。PacBio RSII（Pacific Biosciences）から出力されたロングリードを使用してアセンブリを行った結果、4つの環状レプリコン（染色体1、2、pENH91、pENH92）を取得した。NH9株のゲノムサイズは8.25 Mbp、GC含量は65.5%であった。またPGAP（NCBI）でアノテーションを行いマニュアルで修正したところ、7,415個のCDSを有し、さらにLTTRは174個（各レプリコンでそれぞれ70、87、1、16個）有していることが明らかになった。これらLTTRは、安息香酸やゲンチジン酸等の芳香族化合物分解や、CO₂固定関連遺伝子群（*cbb*オペロン）等の遺伝子発現を制御すると推定された。次に発現しているLTTRを網羅的に捉えるために、トランスクリプトーム解析を行った。クエン酸、安息香酸、3-CB（終濃度各5 mM）を唯一の炭素源として培養し、対数増殖期の菌体からTotal RNAを抽出、MiSeq（illumina）を使用してRNAシーケンスを行った。低発現遺伝子を除去したところ、各実験区とも80個以上のLTTRが発現していた。さらに発現差解析を行ったところ、3-CB特異的に発現変動するLTTRは14個存在し（FDR < 0.001）、発現量が上昇したLTTRは物質の取り込みや有機化合物分解、脂肪酸代謝に関わる遺伝子の発現を制御していると推定された。今後は、他のfamilyの転写調節因子も含めた相互の関係解明を目指して、クロストークの実験的検証を行う。

佐々木 春菜, 永田 裕二, 津田 雅孝, 大坪 嘉行
東北大・院生命

β プロテオバクテリアに属する*Acidovorax* sp. KKS102株は人為起源の難分解性化合物であるポリ塩素化ビフェニル(PCB)の分解細菌である。分解に関係する複数の酵素遺伝子をコードする**bph**オペロンはpEプロモーターより転写される。pEプロモーターの活性は、2つの制御機構の支配下にある。1つはビフェニルが存在しない時に転写を抑制する機構、もう1つはより好ましい炭素源が存在するときに、転写を抑制する機構すなわちカタボライト調節機構である。これまで、本株のカタボライト調節機構に関して、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、酢酸などが抑制炭素源となること、またBphPQよりなる二成分調節系(BphPがセンサーカイネースを、BphQがレスポンスレギュレーターをコードする)がカタボライト調節に関与することが明らかとなっていたが、BphPQがどのようにして抑制炭素源の存在を感知し、pEプロモーター活性に反映させるかについては未知のままである。BphPのC末端側ドメイン(BphPc)とBphQをアラビノースで誘導可能なプロモーター支配下で発現させるプラスミドpNITarabphPcQを大腸菌に導入し、pEプロモーター活性を*gfp*遺伝子をレポーター遺伝子として測定したところ、BphQを単独で発現させたときと比べて、高いGFP活性を示したことからBphPcはBphQを活性化する因子であることが示唆された。大腸菌中で高発現させて精製したBphPcを[γ -³²P]ATPとインキュベーションしたところ、BphPcが自己リン酸化することが観察された。また自己リン酸化したBphPcとBphQをインキュベーションすることでリン酸基がBphQに転移することが確認された。これらの観察は二成分制御系に関する既存の知見と一致するものであり、今後この過程のどこが抑制炭素源の存在によって影響をうけるのかについて解析を行う予定である。現在、リン酸化されたBphQがpEを活性化するかどうかについてのin vitro transcriptionアッセイ系の構築と、リン酸化以外のBphQ翻訳後調節に焦点を当てた解析を行っている。

天木 拓海¹, 坂井 航¹, 山田 竣太², 飯田 和奏², 渡邊 剛志^{1, 2}, 杉本 華幸^{1, 2}, 鈴木 一史^{1, 2}¹新潟大院・自然科学, ²新潟大・農・応生化

Csr (carbon storage regulator)システムは、多くの真正細菌に存在し、バイオフィーム形成、運動性、解糖系、病原性等、様々な遺伝子の発現調節に関わる。大腸菌Csrシステムは2つのタンパク質と2つの小分子RNAから構成されている。CsrAはCsrシステムの活性の中心となるRNA結合タンパク質であり、ターゲットとなるmRNAの5'UTRに結合して翻訳やmRNA安定性を変化させることで転写後の遺伝子発現を調節している。2つの小分子RNA・CsrB及びCsrCは複数のCsrA結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrAを捕捉することでCsrAの働きを阻害する。CsrDはGGDEF-EALドメイン・タンパク質に分類されるが、c-di-GMPの合成・分解には関与せず、CsrB/C RNAのRNase E (Degradosome) 依存的な分解を調節することでCsrAの細胞内での働きを制御している。さらに、PTSタンパク質EIIGlcによってCsrDが活性化されることが明らかとなった。CsrD及びRNase Eが関与するCsrB RNAの分解メカニズムを解明するため、CsrB RNAの分解過程を解析したところ、CsrB RNAの3'末端のターミネーター上流に位置する一本鎖領域内の切断がその後のCsrB RNAの完全分解に必要であること、この切断部位の近傍にCsrAが結合することでRNase Eによる切断が阻害されることが明らかとなった。CsrDはEIIGlcの結合によって活性化される。そこで、コハク酸もしくはグルコースを添加した最小培地で大腸菌を培養し、対数増殖期後期でリファンピシンを添加した後に一定時間ごとにサンプリングしてCsrB RNAの分解について調べた。その結果、グルコース添加培地ではCsrB RNAが速やかに分解されるのに対し、コハク酸添加培地のCsrB RNAの分解は遅かった。さらに、コハク酸添加培地で培養後、グルコースを培地に添加してCsrB RNAの半減期を測定したところ、グルコース添加後速やかにCsrB RNAが分解された。CsrDの活性はEIIGlcを介して速やかに調節され、これによってCsrA支配下の遺伝子群の発現が制御されると考えられた。

野々山 翔太, 大坪 嘉行, 永田 裕二, 津田 雅孝
東北大・院生命

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含むタンパク質は代謝や遺伝子の発現制御等、生命活動の根幹を担っている。主に大腸菌を用いた解析により、鉄硫黄クラスターを合成する機構に複数のタンパク質が関与し、これらをコードする遺伝子はオペロンを形成していることが判明している。本研究に用いた*Burkholderia multivorans* ATCC 17616株は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌である。これまでの解析から、推定鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc*オペロン)は本株の生育に必須であり、*isc*オペロンの先頭には発現制御を担っていると推定される*iscR*とIscRが結合する配列も存在していることを示してきた。そして、実際の解析で、IscRが*isc*オペロンの転写抑制因子であることが強く示唆されていた。しかし、IscRが何を認識して*isc*オペロンの転写調節を行っているかは不明である。そこで本研究ではATCC 17616株における鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群の発現機構解明を目的とし、IscRに着目した解析を行った。まず、ATCC 17616株のIscRのアミノ酸配列を他細菌株のIscRホモログタンパク質のアミノ酸配列と比較した結果、IscRには鉄硫黄クラスターとの結合に関わると推定される3つのシステイン残基が保存されており、ATCC 17616株のIscRは鉄硫黄クラスターと結合する可能性が示唆された。そこで、IscRの3つのシステイン残基をアラニンに置換したIscR-3CAを作製し、*iscR*破壊株に対する相補実験並びに、精製IscR-3CAを用いた*in vitro* 解析を行った。まず、*iscR*破壊株をIscR-3CA発現プラスミドで形質転換した株を用いた解析で、システイン残基を置換することでIscRは転写抑制活性を失うことが明らかとなった。次に、大腸菌を用いた系によって発現・精製したIscR-3CAと蛍光ラベルした*isc*オペロン上流配列を用いて、ゲルシフトアッセイとフットプリント解析を行った。その結果、IscR-3CAは*isc*オペロンのプロモーター領域周辺と特異的に結合することが明らかとなった。以上の結果から、IscRは鉄硫黄クラスターと結合することで*isc*オペロンの転写を抑制することが示唆された。しかし、IscR-3CAも*isc*オペロン上流と相互作用することから、鉄硫黄クラスターと結合していないIscRは別の機能を有している可能性が示唆された。現在、これらについてさらなる解析を行っている。

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

環境細菌の研究は主に実験室系で実施され学術的に大きく貢献してきているものの、本来の棲息環境での生態は未だ不明である。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解明する目的で、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、本手法では土壌での長期間培養の必要性のために増殖中など短い期間での細菌の挙動を調べることができない。そこで本研究では、より短期間での土壌における細菌の適応メカニズムを解明するために、土壌から抽出したRNAを用いてRNA-seqによる網羅的な解析とqRT-PCRによる経時的な解析を行い、液体培養系と比較することで、土壌でのATCC 17616株の挙動を解析した。

滅菌土壌へATCC 17616株を 10^6 CFU/g soilになるように植菌し、30°C、暗所で培養を行い、経時的にCFU測定した。土壌での菌密度が最大に達した時点でRNAを抽出し、RNA-seqを実施した。比較としてコハク酸添加最小液体培地とコハク酸添加土壌を用いた。さらに、このRNA-seqの結果から土壌において重要であると推測された遺伝子についての転写量の経時的変動様式をCFU測定とともに実施した。

RNA-seqにおいて土壌で転写された遺伝子のうち炭素源代謝に関わる遺伝子の割合は液体培地と比べて高く、芳香族化合物分解遺伝子や糖・アミノ酸の取り込み・代謝に関する遺伝子が高い転写量を示した。また、コハク酸非添加土壌のみで核酸や脂肪酸の分解酵素遺伝子の転写が確認された。これらの結果から、土壌中には接種菌の増殖可能な程度の炭素源が存在し、増殖後も土壌の炭素源を利用して異化代謝が行われるが、コハク酸非添加土壌では菌数を維持するための十分なエネルギーを確保できず、細胞構成成分を分解してエネルギーを生産しているものと推測された。代謝酵素遺伝子以外では、細胞表層タンパク質に関係すると推定される遺伝子が複数同定され、そのうちAdhesin合成遺伝子とCollagen-like protein合成遺伝子とも増殖時に液体培地と比べ高い転写量を示し、これらの遺伝子の増殖中における重要性が示唆された。現在、さらなる経時的なRNA-seq解析を実施するとともに、同定した遺伝子の経時的な転写量の解析、破壊株の表現型解析を行い、土壌適応における個々の遺伝子の重要性を解析している。

柳谷 光輔¹, 井上 謙吾², 水口 千穂³, 野尻 秀昭³, 大熊 盛也⁴, 金原 和秀¹, 新谷 政己^{1, 4}

¹ 静大院・総合科技, ² 宮崎大・農, ³ 東大・生物工学セ, ⁴ 理研・BRC-JCM

【背景と目的】 プラスミドは、微生物間における遺伝子の「運び手」であり、その伝播現象は微生物の急速な進化・適応能の原動力となる。従ってプラスミドの宿主域の情報は非常に重要である。従来、プラスミドの宿主域は、好気条件下で行われた接合伝達実験の結果に基づいて決められてきた。しかし、実際にプラスミド伝播が生じる土壌、堆肥、動物体内などには、多くの微好気・嫌気環境が存在する。本研究は、微好気・嫌気条件下におけるプラスミド伝播の実態の解明を目的とし、広宿主域プラスミドとされる pBP136 を用い、同条件下でプラスミドが接合伝達するか検証するとともに、好気条件と比べてその宿主域が変化するかを調べた。【方法】 供与菌には、絶対好気性細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株の派生株、SMDBS 株を用い、受容菌には通性嫌気性を示す菌株を用いて接合実験を行った。各供与菌と受容菌を好気条件下で培養し、その混合液を嫌気チャンパー内でフィルター接合させ、30°C で 24 h 静置後、選択培地に塗布して接合完了体を選抜した（微好気条件）。その後、接合伝達頻度を算出し、好気・微好気条件における頻度の比較を行った。また、牛糞中の不特定多数の微生物を受容菌候補とした場合の好気・微好気条件下における接合実験も行った。【結果と考察】 受容菌として *Buttiauxella agrestis* JCM 1090T, *Patoea agglomerans* JCM 1236T, *Pseudomonas stutzeri* JCM 5965T を用いた結果、好気・微好気条件双方で接合完了体を検出することに成功し、pBP136 が微好気条件下でも伝達することが示された。また微好気条件下の接合伝達頻度が、好気条件下より約 1/100~1/1000 低下し、酸素が接合伝達の高効率化に寄与することが示唆された。現在嫌気条件下で生育可能な供与菌・受容菌を用いた伝達頻度についても調査している。また、牛糞中からも接合完了体を検出することに成功し、その一部は通性嫌気性細菌 *Serratia* 属類縁細菌であることが判明した。本属類縁株は、以前土壌細菌を対象とした好気条件下の伝達実験¹⁾では得られなかった。現在、フローサイトメトリーを用いて好気・微好気条件下でプラスミドの宿主域が変化するか調べている。1) Shintani et al., 2014. Appl Environ Microbiol., 80: 138

安田 まり奈¹, 豊福 雅典², 森永 花菜¹, 尾花 望², 野村 暢彦²¹筑波大学・生命環境科学研究科, ²筑波大学・生命環境系

微生物はメンブレンベシクル (MV) を生産する。MVとは、微生物が自身の膜から生産するナノサイズの球状構造体である。このMVには核酸・タンパク質・シグナル物質が含有されていることから、それらの運搬体として働き、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生産機構についての知見は乏しく、実環境中の微生物の挙動を理解するためにもMV生産機構の詳細な解析が必要である。先行研究において、*Pseudomonas aeruginosa*の集団中の一部の菌で、菌体が破裂するような溶菌現象によってMVが生産されることが明らかとなった (Turnbull, M Toyofuku *et al.* 2016. *Nat Commun.*)。このECLによるMV生産はSOS応答を介して誘導され、このMV生産誘導にはそれぞれendolysinとholinをコードする*lys*と*hol*遺伝子が必要であることが明らかとなった。これらの遺伝子の機能的ホモログが多くの微生物のプロファージ領域に保存されていることから、*lys*と*hol*を介したMV生産機構は微生物において普遍的であることが予想される。本研究では、土壌脱窒細菌*Paracoccus denitrificans*を用いて、異種細菌においても*P. aeruginosa*と同様なMV生産機構があることを検証し、その詳細を明らかにすることを目的とした。*P. denitrificans*において、DNAにダメージを与える薬剤 (MMC) を加えたストレス条件下にてMV生産量が増加することが明らかとなった。さらにストレス応答因子である*recA*破壊株においてストレスによるMV生産誘導が見られなくなったことから、本MV生産機構はSOS応答を介して制御されていることが示唆された。このことより、*P. aeruginosa*と同様なMV生産機構が存在することが予想された。ストレス条件下で生産・精製されたMV画分に含まれるDNAの全ゲノムシーケンスを行ったところ、興味深いことにプロファージ領域由来のDNAの蓄積が見られ、蓄積されていた遺伝子の中から推定*lys*遺伝子が見つかった。 Δlys を作製しストレス条件下でのMV生産量を評価したところ、 Δlys においてはMV生産が誘導されなかった。以上より、*P. denitrificans*におけるストレス条件下でのMV生産には、プロファージ領域由来の*lys*が必要であ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上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。本研究は科研費によるゲノム支援の支援を受けた。

溶原性ファージは宿主細胞がUVやマイトマイシンC (MMC) といったDNA障害を引き起こすストレスにより誘導される。誘導されたファージは宿主細胞を溶菌し、細胞外に放出されるため、溶原性ファージが宿主染色体に安定的に存在するためには、通常状態では誘導を抑制する一方、ストレス時には速やかにその抑制が解除される仕組みが必要である。枯草菌168株は10個のプロファージ領域を持つが、この内、PBSXファージは分泌タンパク質のプロテオーム解析から、DNAストレスを受けていない状態においても細胞外に放出されていることが明らかとなっている。PBSXの誘導は細胞死を引き起こすためこの非ストレス時の放出は一部の細胞でのみPBSXの誘導が起きていることを示唆する。そこで、本研究ではこのPBSXの誘導機構について解析することとした。PBSXファージの誘導を可視化するために、PBSXの後期遺伝子オペロンのプロモーター (P_L) の蛍光レポータープラスミドを作成し、フローサイトメーターにより、PBSX誘導細胞の割合を測定した。LB培地による培養では2 %の細胞で蛍光が観察され、非ストレス条件下一部の細胞でPBSXファージの誘導が起きていることが示された。DNAストレスを受けた際のPBSXの誘導にはDNA損傷応答であるSOS応答に関与するRecAが必須であることが明らかとなっている。RecA欠損株において、同様の解析を行ったところ、蛍光が観察されなかったことから、非ストレス条件下においても一部の細胞でDNA損傷が生じ、PBSXの誘導が起きていることが示唆された。そこで、SOS応答遺伝子であるtagCの遺伝子発現を同様に蛍光レポーターを用いて解析したところ、非ストレス条件下で5 %の細胞で蛍光が観察され、SOS応答が起きている細胞の一部でPBSXの誘導が起きていることが考えられた。MMCを添加し、DNAストレス時のtagCの発現とPBSXの誘導を解析したところ、 P_{tagC} レポーター株ではMMC濃度が高くなるにつれ蛍光強度が高くなった。一方、 P_L レポーター株では蛍光を発する細胞と発しない細胞の二集団が見られ、二峰性の遺伝子発現を示した。また、この時、MMC濃度により、蛍光を発する細胞の蛍光強度は変化せず、蛍光を発する細胞の割合が変化した。従って、SOS応答は全ての細胞で生じ、かつ、ストレスの強度に応じて遺伝子発現量を調節する一方、PBSXファージの誘導はストレス強度に応じて誘導される細胞の割合を変化させていることが明らかとなった。

李 岩沢¹, Pascal Hingamp², 綿井 博康³, Romain Blanc-Mathieu¹, 吉田 天士³, 緒方 博之¹

¹京都大・化研, ²CNRS, IGS UMR 7256, Aix-Marseille Université, ³京都大・院農

Megaviridae is a proposed family of eukaryotic viruses classified in the group of nucleocytoplasmic large double-stranded DNA viruses (NCLDV). Genomic data suggest that the diversity of Megaviridae is vast and perhaps greater than that of cellular organisms. In the present work, we aimed at characterizing the diversity of Megaviridae at different sites using high-throughput sequencing analysis of PCR-amplified DNA polymerase family B (PolB) gene. PolB is encoded in all available Megaviridae genome sequences but its high level of divergence makes it impossible to design a single PCR primer pair that would amplify all known Megaviridae PolB sequences. To overcome this limitation, we designed 82 degenerate primer pairs in 923 PolB sequences of isolated and environmental Megaviridae species. In silico tests demonstrated that this set of primer pairs specifically covers 97.4% of the 923 PolB sequences. We tested all 82 primer pairs on 5 environmental DNA samples extracted from water samples collected at Osaka Bay, Japan Sea, Miyuki hot spring and a mangrove site of Ishigaki island. A preliminary analysis of the reads from Osaka Bay sample revealed that there are >5,000 OTUs for Megaviridae at 97%-identity clustering. Estimates of Megaviridae species diversity in these 5 environments will be presented along with the bioinformatics pipeline we developed to analysis this unique dataset.

Boxi Wang¹, Syu-ichi Sugiyama²¹岩手大学連合農学, ²弘前大学農学生命科学部

Microbiome is a collection of microbes' genomes inhabiting inside or surface of organisms. It is known that almost all plant species harbor a wide diversity of microbes in the root in which diverse microbe community is usually established. However, it is not well clarified whether are there any rules in constructing root microbe community among different plant species. In this study we tried to clarify how plants select different microbial community in their root? Twenty plant species from different families were used as materials. Plants of each species were grown in pots with identical soil in greenhouse. Plants were harvest at 4 to 8 weeks depending on growth rate and DNA of plant root and soil were extracted for metagenome analysis. Microbe structure of each plant was determined by next-generation sequencing (Miseq) for both bacteria (16s rRNA V4 region) and fungi (ITSII region). For bacteria both soil and plant root microbiome were dominated by a small number of taxa such as Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes. There were significant differences in microbiome structure between plant species. NMDS analysis showed that plant root microbiomes largely diffused among plant species even when grown under single soil sources.

小森 隆弘¹, 津留 三良²¹大阪大・院情報, ²東京大・院理

あらゆる生物は限られた資源を利用して増殖している。資源の枯渇が生じる環境条件では、増殖率（ r 戦略）よりも環境収容力の向上（ K 戦略）が重要な適応戦略となりうる。 K 戦略が進化的にどのようにして生じるかを調べる上で、実験室内のよく管理された環境で行う進化実験は、有効な手法の一つである。標準的な進化実験で用いられる均一に攪拌された培養系では、環境収容力よりも増殖率の増加する変異が選択されやすいことが知られている。この問題を回避する手法として、先行研究ではエマルションを用いた小区画に微生物を封入して培養することで増殖率に対する選択圧を緩和し K 戦略進化を誘導する進化実験系が提案されている。しかし化学的に構成された区画は不安定であり、世代数が区画ごとに大きくばらつく、あるいは微生物と区画の相互作用により区画構造自体が変化して環境収容力以外の選択圧がかかる恐れがある。本研究では区画構造が変化しない汎用的なマイクロプレートを用いて微生物を区画化し培養する進化実験系を構築し、実際に K 戦略進化を観察することを目指した。実験においてはアミノ酸要求性の大腸菌を96ウェルマイクロプレートにて培養した。アミノ酸濃度によって環境収容力が制限される培地到大腸菌を加え、マイクロプレートの各ウェル内で振盪培養を行った後、最も高い濁度（OD）に達したウェルを選択しその菌液を次の培養に用いた。ウェル内の初期集団サイズ、すなわちボトルネックを大きくした場合（10000細胞）と小さくした場合（1細胞）の2通りでそれぞれ12系列ずつの進化実験を行い増殖がどのように変化するか確かめた。進化実験の前後で凍結ストックとした菌の増殖を比較した結果、ボトルネックの小さな条件においては飽和時のODが過半数（12系列中の7系列）において有意に増加した一方、増殖率は過半数（12系列中の7系列）で有意に減少した。ボトルネックの大きな条件においては飽和時のODが過半数（12系列中の7系列）において有意に増加し、増殖率も半数の系列（12系列中の6系列）で有意に増加した。これらの結果から、ODが増加し環境収容力の向上したものを選択できていると考えられる。またボトルネックを小さくすることで増殖率に対する選択圧を緩和し増殖率の増減に左右されずに変異体を選択できたと考えられる。

高坂 智之^{1, 2}, 山下 舞子³, 中島 康之³, 松谷 峰之介¹, 山田 守^{1, 2}¹山口大院・創成科学, ²山口大中高温微生物センター, ³山口大院・医学系

【目的】異なる環境への適応は微生物の重要な性質と生存戦略であり、その適応は細胞内のタンパク質の構成を変えるだけでなくゲノムへの変異によっても達成される。我々は微生物を限界温度に適応させ、その生理的及び遺伝的变化を解析することにより、微生物の耐熱化機構を明らかにすることを目的とする研究を実施している。エタノール生産菌である *Zymomonas mobilis* は、限られた糖からのエタノール発酵によってのみ生育するため、異化代謝が限定されていることから、耐熱化に必要な細胞の機能を明らかにしやすいと考えられる。我々は、最も耐熱性の高い *Z. mobilis* TISTR 548 を対象に限界温度での適応育種による耐熱化を実施し、80M 及び 200M という耐熱化株を獲得した。これまで耐熱化株の生理学的解析を進めてきており、耐熱化株は高温での活性酸素種の蓄積と細胞伸長が抑えられることを明らかにした。本研究では、耐熱化株の変異がどのような遺伝子に起こり、そしてそれら変異が耐熱化に寄与しているのかを明らかにすることを試みた。【結果・考察】TISTR 548 の高温の生育限界温度は38℃であったが、80M は39℃、200M は40℃とそれぞれ向上した。これら耐熱化株のゲノム解析を illumina シーケンサーによって実施し、80M において4箇所の変異、200M において8箇所の追加の変異を予測するとともに、サンガー法によってそれぞれの変異を同定した。これらの変異遺伝子は、転写制御、シグナル伝達、膜関連機能、そして補酵素の代謝に関わるタンパク質をコードしていた。このことから TISTR 548 が耐熱化する際には、細胞内代謝の改変と細胞膜の機能変化を起こしている可能性が示唆された。次に、これらの変異を親株である TISTR 548 に対して、アミノ酸置換の場合はそのまま変異の導入を、遺伝子破壊が起こっている場合はその遺伝子の完全破壊を、大腸菌と接合プラスミドを利用して試みた。これまでに、全ての対象遺伝子について変異導入もしくは破壊用プラスミドを組み込んだ株を構築し、大半の二次組換え株を取得した。これら変異導入株及び遺伝子破壊株の性質と耐熱化機構について考察したい。

大島 直人, 鈴木 匠爾, 黒沢 則夫
創価大・院環境

好熱菌に関する研究は共通祖先の探求に繋がると考えられている。生物の基本的なメカニズムを研究するためには、遺伝子操作ツールが必要不可欠である。超好熱性クレニアキア *Sulfolobus acidocaldarius* は、遺伝子操作系の開発と改良が勢力的に行われてきたが、その形質転換効率は現時点で $10^4/\mu\text{g}$ DNA 程度であり、大腸菌や酵母などの代表的なモデル微生物と比較すると非常に低い。本種を用いた遺伝子ライブラリーの作製や、ライゲーション反応液を直接用いた形質転換を可能とするためには、少なくとも $10^6/\mu\text{g}$ DNA の形質転換効率を達成する必要がある。本研究では、*S. acidocaldarius* の形質転換効率の向上を目的として、コンピテントセルの作製方法とエレクトロポレーションの各パラメーターの最適化を試みた。宿主として *pyrE* および *suaB* 遺伝子を破壊した *S. acidocaldarius* SK-1 株を、プラスミドベクターとして *pyrE* 遺伝子をマーカーとする pSAV2 を用いた。コンピテントセルの作製条件として、増殖時期 (OD_{600})、細胞を再懸濁する際のスクロース水溶液の濃度と細胞密度について検討した。またエレクトロポレーションの条件としては、印加電圧と印加時間について検討した。エレクトロポレーション後の細胞懸濁液をプレートに塗布し、 75°C で7日間培養後にプレート上に出現したコロニーを形質転換体として計数した。コンピテントセルの作製条件の検討では、 OD_{600} の値が0.7付近の培養液由来の細胞を、25 mM のスクロースに 2.5×10^9 cells/mL となるように再懸濁した時に最も高い形質転換効率を得られた。また、エレクトロポレーションのパラメーターの検討の結果、印加電圧と印加時間の最適値は、それぞれ20 kV/cm および13 ms であった。以上の最適化により、従来の約10倍の形質転換効率 ($3 \times 10^5/\mu\text{g}$ DNA) が得られた。エレクトロポレーション後の回復培養の条件検討など、まだ最適化が可能なパラメーターは残されていると考えており、今後そのような条件検討を行うことにより、形質転換効率 $10^6/\mu\text{g}$ DNA を目指したい。

小林 幸平¹, 小池 春奈¹, 時下 進一², 太田 敏博²¹東京薬科大学・院生命, ²東京薬科大学・応用生命

[背景] 高度好熱菌は高温下で生育するため、常温菌より高い酸化ストレス耐性を持つ。近年、複数の細菌にて酸化ストレス防御に鉄貯蔵タンパク質(ferritin-like protein)の関与が示唆されている。このタンパク質は 12/24量体の中空球状構造を形成し、細胞内の Fe²⁺ を Fe³⁺ として貯蔵、余剰な Fe²⁺ を調節してフェントン反応を抑制する。そのため活性酸素種であるヒドロキシルラジカル量を減少させることが示唆されている。*T. thermophilus* HB27では、少なくとも、TTC1118とTTC0618の二種類のferritin-like protein遺伝子が存在する。これまでに、その欠損株の解析から、両遺伝子が過酸化水素耐性に重要であることを明らかにしている。そこでTTC1118の発現制御を明らかにするために、過酸化水素と培地の栄養条件の変化、増殖相による発現制御の解析を試みた。[方法] β -グルコシダーゼ (Bgl) の上流に TTC1118のプロモーターとその上流配列を挿入したレポータープラスミドを bgl 遺伝子を欠損した *T. thermophilus* に導入した。まず、増殖相による発現変化をBgl 活性により解析した。TTC1118のプロモーター活性を過酸化水素（最終濃度 5mM）による酸化ストレス、最少培地による飢餓ストレス、さらに、培地に含まれるイオン量を変化させた培養条件下で解析した。次にTTC1118のタンパクレベルでの発現を解析するため、その C 末端側に FLAG タグを融合した TTC1118遺伝子の発現ベクターを作製し、この発現ベクターを保持する菌株を上記条件下で培養し、それぞれからタンパク質を抽出、SDS-PAGE後、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにより発現量を調べた。また、この誘導に関わるシスエレメントを解析するために、TTC1118のプロモーター上流配列に見出した回文配列を欠失したレポータープラスミド を作製し、そのプロモーター活性も調べた。[結果] TTC1118 遺伝子の発現は対数期から定常期にかけて増加が認められた。酸化ストレスでは遺伝子の発現は変動しなかったが、飢餓ストレスでは約2.6倍の転写量の増加が認められ、タンパクレベルでも増加が認められた。一方、培地中のイオン量を変化させた場合はTTC1118遺伝子の発現に大きな変化は認められなかった。プロモーター上流の回文配列を欠失させても飢餓ストレスによる誘導が認められた。以上の結果より、TTC1118の飢餓による発現誘導はシグマ因子による誘導の可能性が推定された。

飯塚/Iizuka 朋代/Tomoyo^{1, 2}, 池尾/Ikeo 一穂/Kazuho^{1, 2}¹総研大・遺伝学, ²遺伝研・生命情報

本研究では担子菌門ハラタケ綱の菌糸隔壁部にみられる微細構造である隔壁孔キャップ(Septal pore cap; SPC)に着目し、新規形態形質の複数回にわたる独立な出現（平行進化）をもたらした遺伝基盤の解明を目指している。演者らはこれまでにオーソログの配列相同性比較に基づくゲノムワイド解析を行い、有力な候補遺伝子として*spc33*を検出した。しかし、分子レベルにおける*spc33*と平行進化の関連は不明であった。そこで、SPCの平行進化と相関のあるアミノ酸置換を調べることを目的として、*spc33*のアミノ酸配列の中から表現型の進化が起きたときに変異したと考えられるアミノ酸サイトを探索した。解析には、アミノ酸配列の祖先配列推定を使用した。その結果、平行進化が起きたと推定される分岐点での同一置換パターンのアミノ酸変異（平行置換）が、局在している領域を検出した。このうち2サイトについては、平行置換によって変化したアミノ酸残基が現生種においてもそのまま保存されていた。このことから、*spc33*のアミノ酸配列には形態形質の平行進化と相関する平行置換が起きていることが示唆された。また、演者らは担子菌類12種のオーソログのセットについても同様の解析を行った。その結果、平行置換を多く保有している遺伝子が新たに検出された。検出された遺伝子群には*spc33*も含まれていた。これらの遺伝子について、データベース4種の情報を用いて機能を調べた結果、SPCと関連する機能を持つと推測される遺伝子が複数検出された。本学会では*spc33*に加えて、得られた他の候補遺伝子についてもSPCの進化に関わった可能性について議論する。

江橋 由夏¹, 河嶋 伊都子¹, 尾花 望², 久保田 浩美³, 清川 達則¹, 八城 勢造³, 永井 智³, 野村 暢彦²¹筑波大・院生命環境科学, ²筑波大・生命環境, ³花王・安全性科学研

乳酸菌の一種である*Lactobacillus plantarum*は、発酵食品等に利用される一方、食品変敗を引き起こす危害菌として報告され問題視されている。また本菌を含め実環境中の多くの微生物はバイオフィルム(BF)と呼ばれる微生物の高次構造体を形成し集団で生息している。本菌はBF形成によりストレス耐性が上昇することが明らかとなっており、BF状態における乳酸菌の制御法が求められている。先行研究において実環境中から単離した*L. plantarum*の集団中では莢膜（細胞表面の多糖層）の合成量が異なる2種のコロニー形態（Compact colony: Cc、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を各々単離し形成させたBFでは、その構造やストレスに対する特異性が異なることが示されたため、実環境中では両者の共存によりBFの性質が変化すると予想される。そこで本研究では*L. plantarum*環境単離株における相変異機構の解明を目的とした。トランスクリプトーム解析によりCcに比べMcでは莢膜合成に関与する*cps2*オペロンの発現量が上昇していると分かった。そこで*cps2*オペロンについて挿入変異株を作製したところ、変異株からはCcのみが出現したため、*cps2*オペロンが相変異の原因であると示唆された。さらにCcとMc間ではプロモーター領域を含む*cps2A*上流の一部配列に逆位が認められた。逆位による*cps2*オペロンの転写制御によって、Mcでは*cps2*オペロンの発現量及び莢膜産生量が増加していると考えられた。また継代培養を経たCc、Mcにおいても同領域に逆位が認められ、部位特異的な逆位に伴い莢膜産生量が変化し相変異を繰り返していると示された。実環境中では乳酸菌集団内にCcとMcが混在している。そこでCcとMcを共培養し集団中の存在比を解析した。CcとMcの初期植菌量を変化させ検証した結果、初期植菌量の割合によらずBF中にはCcが多く存在することが分かった。Ccは基質付着能が高いことから、Ccが足場となり両者が共存するBFが形成されると示唆された。以上の結果より、実環境中では*L. plantarum*のBF中に常に一定の割合でCcとMcが共存すると考えられる。ストレス耐性の特異性が異なるCcとMcでヘテロな集団を形成することで、様々なストレス存在下における集団全滅のリスクを低減していると予想される。さらに配列逆位を伴う相変異によってヘテロ集団を常に保持し環境適応を図っていると推測される。

長谷川 万純^{1,2}, 伏見 圭司², 及川 雄貴², 榎本 元³, 池内 昌彦³, 吉澤 晋¹, 成川 礼²¹東京大学 大気海洋研究所, ²静岡大学 理学部 生物科学科, ³東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

シアノバクテリアは変動する光環境下でも効率良く光合成を行うために、高度な光応答機構を備えている。その中心的な役割を果たしているシアノバクテリオクロム（CBCR）は、植物の光センサーであるフィトクロムに類似しているが、フィトクロムと比べて分子サイズが小さく、吸収波長が可視光をほぼ網羅するほど多様化している。*Acaryochloris marina*は、光合成反応中心色素としてChl. *a*よりも長波長の光を吸収するChl. *d*をもつユニークな海洋性シアノバクテリアである。本研究では、*A. marina*に存在する機能未知CBCRのうち、DXCF型と呼ばれるCBCRに着目した。DXCF型CBCRは、色素との結合に重要なCys残基に加え、第二のCys残基を有する。第二のCys残基が光変換過程で色素と可逆的に脱着し、色素内の共役系の長さを変えることで大幅な吸収波長シフトが生じる。*A. marina*から7つのDXCF型CBCR候補を見だし、これらを色素産生大腸菌に発現させ精製し、その分光特性を解析した。その結果、6つのCBCRが色素と結合し、このうち5つが2つの光質間の可逆的な光変換を示した。青／緑色光、青／ティール光、緑／ティール光、青／橙色光変換という4種類の光変換が見いだされた。残る1つであるAM1_1870g4は2つの光質間の光変換を示さず、青色光照射により青色光領域の吸収が僅かに上昇し、暗環境で速やかに元に戻る暗反転を示し、低温ほどその速度は遅かった。野外環境の光量域・温度域において、光活性化型の存在量は光量と温度の二つの因子に依存していた。このことから、AM1_1870g4は青色光の光量と温度という2つの情報を統合して感知する光センサーであると示唆された。これまでに緑色光や赤色光の光量に応答するCBCRは同定されているが、青色光の光量に応答するものは本研究が初めてである。*A. marina*は当初ホヤとの共生体として単離されたが、その後の研究から近縁種は海洋においてfree-livingで存在することがわかっている。海洋の深部には赤色光や緑色光は届きにくいこと、青色光はエネルギーが強く、低温下では光合成の暗反応が律速することから、青色光の光量を温度依存的に感知することは光合成生物にとって重要である。他のシアノバクテリアでは、フラビン結合型青色光センサーがその役割を果たすと考えられるが、*A. marina*では典型的なフラビン結合型青色光センサーが検出されないため、その役割をAM1_1870g4が果たしているのかもしれない。

大野 裕之¹, 山口 剛士², 武邊 勝道²¹松江工業高等専門学校 生産・建設システム工学専攻, ²松江工業高等専門学校 環境・建設工学科

近年、窒素除去プロセスとしてアナモックス反応が注目されている。アナモックス反応のプロセスは、亜硝酸還元、ヒドラジン合成、ヒドラジン酸化の3つから構成されており、ヒドラジン酸化に関与する機能遺伝子 (*hzo*遺伝子) は、アナモックス細菌が特異的に有すると報告されている。しかし、その機能遺伝子のコピー数は16S rRNAに比べ極めて少なく、従来のFISH法による視覚的検出が困難である。機能遺伝子の視覚的検出にはhorseradish peroxidase (HRP) を用いた高感度FISH法が用いられている。しかし、アナモックス細菌は、細胞内にHRP酵素に類似した酵素を有しており、その酵素を失活させる処理の最適化が困難であるといった報告もされている。従って、従来の高感度FISH法の適用が困難である場合があると考えた。そこで本研究では、酵素を用いない高感度FISH法であるquickHCR-FISH法とazideとalkyneによる簡便で特異的な結合が可能なclick chemistryに着目し、内在性酵素の処理を必要としない機能遺伝子の視覚的検出技術の開発を行っている。本研究では、*hzo*遺伝子を標的としたalkyne付加プローブ作製のために組み換え体の作製をした。*hzo*遺伝子を有したベクターは、アンピシリン耐性遺伝子をもつベクターに*hzo*遺伝子 (Accession Number : CAJ72085) を挿入させ作成し、*E.coli* DE3株に形質変換を行った。その後、*hzo*遺伝子を標的としたPCRにより*hzo*遺伝子の有無を確認した。次に、click chemistryに必要なalkyne付加プローブを作製するためにPCRによるalkyne付加を行った。PCRは、PCR-Click 488 kitを用いて行い、プライマーは、*hzo*遺伝子を増幅できるana-*hzo*1F-ana-*hzo*2Rを用いた。その結果、目的産物が得られたことから、*hzo*遺伝子を標的としたalkyne付加プローブの作製に成功したと判断した。現在、プローブ作製において収量増加させることを目的として反応液中のMg²⁺の濃度の最適化を行っている。その後、*hzo*遺伝子を有した組み換え体に対して本手法を適用させ、実験条件の最適化を行う予定である。

大城 聡, 三浦 雅史, 鈴木 園枝, 大津 巖生
筑波大学・高細精医療イノベーション研究コア

【目的・方法】我々は、システイン（Cys）およびエルゴチオネイン（ERG）などのアミノ酸発酵生産の実用化を目指した研究を進める中で、硫黄代謝関連化合物種（Cys・グルタチオン・ERG代謝）や各種ポリスルフィド化合物の分離・定量解析技術を慶応大学医学部末松誠教授と共同で開発した。本技術は、チオール基のモノプロモピマンによる修飾法と高速液体クロマトグラフィ質量分析（LC-MSMS）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、たったの20分間で約50種の硫黄代謝関連化合物種の網羅的な一斉解析が可能であり、我々は「サルファーインデックス解析（SI解析）」と呼んでいる。本報告では、食品（ニンジン、ワインおよびビール類）のSI解析を行い、統計ソフトRのパッケージの1つであるVegan（多次元尺度法）を用いて解析結果の「見える化」を行った。【結果・考察】ニンジンの結果では、産地の異なるニンジン種の栽培方法（有機農法や減農薬農法あるいは慣行農法）、甘さや鮮度といった違いを見出すことができた。加えて、ニンジンは抗酸化物質であるERGを合成できないが、ニンジンからERGが検出されたことから、土壌微生物が合成したERGをニンジンが積極的に取り込み・蓄積したと考えられる。従って、土壌微生物とニンジンの共役関係が示唆された。また、市販ワインの結果では、酸化防止剤添加群と無添加群の2つのグループに分類でき、ビール類の結果では、生ビール、発泡酒およびノンアルコールビールに分類できた。以上のことから、硫黄代謝関連化合物を一斉検出する「SI解析」は食品の鮮度を「見える化」可能であることがわかった。この「見える化」は硫黄化合物の酸化還元による分子変換を生じやすい性質を反映しており、酸化還元度および抗酸化能を指標として分類されることが明らかとなった。硫黄は全生物に必須の原子であるため、「SI解析」のこの特性を活かして様々なサンプルを「見える化」したいと考える（本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて実施した）。

田中 尚志¹, 氏本 貴仁², 齋藤 聡司³, 阿部 哲也³, 大津 厳生¹¹筑波大 高細精医療イノベーション研究コア, ²奈良先端大 バイオサイエンス, ³協和発酵バイオ 生産技術研究所

微生物は、自身の生育に必要な要素や各種生体構成成分を合成するために、環境中から無機物を取り込み、有機物に変換している。例えば、炭素源としてグルコースを取り込み、窒素源及び硫黄源としてアンモニウムイオンや硫酸イオンなどを取り込み、3-ホスホグリセリン酸、グルタミン酸、システイン等の様々な有機物に変換している。これらの無機物から有機物への変換経路はそれぞれ炭素同化経路、窒素同化経路、硫黄同化経路と呼ばれている。微生物は細胞増殖と物質生産を調節するために、細胞内の炭素量・窒素量・硫黄量を厳密に制御していることから、それぞれの同化経路は協調的に制御されていると考えられている。しかしながら、同化経路間の相互制御のメカニズムについてはほとんど理解が進んでいない。そこで、本研究では環境中に含まれる硫黄源の変化に対して、大腸菌の炭素同化経路がどのように調節されているのかについて理解を深めることを目的とした。大腸菌には、硫酸イオンとチオ硫酸イオンを硫黄源とする2種類の硫黄同化経路（硫酸経路とチオ硫酸経路）を有している。そこで、単一硫黄源として硫酸塩またはチオ硫酸塩を含む最少培地で大腸菌を生育させ、各種硫黄源が炭素同化（炭素源としてはグルコースを使用）に及ぼす影響について調べた。その結果、チオ硫酸を単一硫黄源とした最少培地を用いた場合では、大腸菌が硫化水素を生成すること、また興味深いことに、培地中のグルコースが完全に消費された直後に硫化水素が生成されることを見出した。一方、硫酸を単一硫黄源とした場合では硫化水素生成が全く認められなかった。したがって、大腸菌のグルコース枯渇時の硫化水素生成には、チオ硫酸イオンの同化経路反応が関与していることが判明した。さらに、炭素代謝経路の遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子であるCrpが、この硫化水素生成に必須であることを明らかにした。これらの結果は、Crpが環境中の硫黄源を感知することによって硫黄同化経路と炭素同化経路を協調的に制御しており、代謝経路間の調節メカニズムのシグナル因子として硫化水素（あるいは硫化物イオン）が機能する可能性が浮上した。

城山 真恵加¹, 三浦 雅史², 河野 祐介¹, 大津 厳生¹¹筑波大・高精細医療イノベーション研究コア, ²奈良先端大・バイオサイエンス

当研究室では、微生物においていまだに未知の部分が多い硫黄代謝の系路・制御機構・遺伝子機能同定に関する研究を行い、その応用として、有用硫黄化合物種（システイン（Cys）、グルタチオン（GS）、エルゴチオネイン（ERG））を生産する大腸菌を育種している。含硫アミノ酸の中でも高抗酸化性かつ安定性が高いERGは多くの生物に存在するが、生合成できるのはキノコなどの菌類と一部の細菌のみであり、動物や植物は生合成できない。そのため、ヒトは食事からERGを摂取・吸収することで、その抗酸化能を健康・生存の維持に利用している。ただし、残念ながらERGの安価な大量生産法は現存せず、さらに、一般的な食事のみから十分量の摂取をすることも困難である。したがって、本研究では、「微生物が生産するERGを始めとする多様な有用硫黄化合物種を含有させた機能性アブラナ科作物の創生」を目的とした。ERGを高含有させた作物を創生するために、まず、「葉物野菜であるアブラナ科のミズナ、ノザワナ、コマツナと、キク科のレタスについて、ERGを根から吸収させることが可能か」を検証した。各種作物を水耕栽培し、収穫前日に水耕栽培液に精製標品ERG（終濃度10 μ M）を添加した。各葉茎部を収穫し、すり潰した抽出液をLC/MS/MSを用いて解析した。その結果、ミズナ、ノザワナ、コマツナの葉でERG蓄積が認められ、中でもノザワナでは、重量ベースの比較で、一般にERG含量が高いとされるキノコ類（シイタケ）を上回った。次に、「微生物にERGを発酵生産させた培養液でも同様の結果が得られるのか」について検証した。同様に、ノザワナを水耕栽培し、ERG発酵生産大腸菌の培養液（菌体は含まない、ERG終濃度100 μ M）を施肥した。その結果、精製標品ERGと同様に発酵生産由来ERGもノザワナ葉中に蓄積が認められた。以上より、植物が、CysやGSHより抗酸化能が高く、全生物にとって必須な含硫黄アミノ酸ERGを吸収することは合理的であると考えられる。今後、ERGだけでなく他の機能性硫黄化合物が作物に吸収されるか検証、作物種毎の特徴に応じたバラエティーに富む高機能作物の育種を行う予定である。

茂木 久恵, 高妻 篤史, 渡邊 一哉
東葉大・院生命

【背景・目的】微生物は、環境の変化に適応するための様々な生存戦略を有している。例えば通性嫌気性細菌の *Shewanella oneidensis* MR-1 株は、酸素に加え、様々な無機・有機化合物を電子受容体とする多様な嫌気呼吸能を持ち、その一つとして、細胞外電子伝達系を使って細胞外の固体へ電流として電子を放出する。そこで、MR-1 株が環境変化に応答してこれら呼吸系をどのように制御しているかは、微生物の生存戦略という観点から大変興味深い。今までの研究により、多くの嫌気呼吸系遺伝子の転写がグローバルレギュレーター cAMP receptor protein (CRP) により制御されていることが明らかになっている。さらに我々は、メチオニン代謝を制御する転写因子として知られている MetR が、MR-1 株の電流生成などを抑制することを見出した。この発見は、メチオニンまたはその代謝産物が MR-1 株の嫌気呼吸系を制御するシグナル分子として働くことを示唆している。そこで本研究では、メチオニンをシグナルとするグローバルな遺伝子発現制御の解明を目指し、MetR により MR-1 株の嫌気呼吸系遺伝子の発現がどのように制御されるかを検討した。【方法・結果】MR-1 株のゲノムにおいて、大腸菌の MetR の結合モチーフに類似した配列が細胞外電子伝達系遺伝子を含む複数の嫌気呼吸系遺伝子上流に保存されていた。精製 MetR タンパク質を用いたゲルシフトアッセイの結果、MetR はこれらの配列に特異的に結合することが示された。また、MetR 結合配列の多くは、嫌気呼吸系遺伝子上流域に保存されている CRP 結合配列の下流に位置しており、MetR は CRP による転写活性化を阻害することによって嫌気呼吸系を抑制する負のグローバルレギュレーターとして機能することが明らかになった。以上の結果は、MetR の発現を抑制するメチオニンが、嫌気呼吸系を活性化するシグナルとして働くことを示している。本研究の成果は、アミノ酸が細菌の異化代謝のグローバル制御を誘導することを示す初めての例であり、新たに発見された細菌の生存戦略として興味深い。現在、他の細菌においても同様のメチオニンシグナル機構が存在するかについて検討を行っている。

加藤 寛子¹, 横山 佳奈², 尾花 望¹, 久保田 浩美², 八城 勢造², 永井 智², 野村 暢彦¹
¹筑波大院・生命環境, ²花王・安全性科学研

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。特に*Paenibacillus*属細菌の芽胞は芽胞殺菌剤として使用される過酢酸に対しても耐性を有することから、食品等製品の微生物汚染の要因として問題視されている。当研究室先行研究により、*Paenibacillus*属細菌環境単離株はバイオフィー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。実環境において大多数の微生物がバイオフィームを形成して生育していることから、我々はバイオフィーム由来芽胞の特性を理解することが重要であると考えた。そこで本研究では、バイオフィーム中に形成される芽胞の解析を行った。*Paenibacillus*属細菌環境単離株の中で高いバイオフィーム形成量を有する*P. polymyxa*、*P. glucanolyticus* および*Paenibacillus sp.*のバイオフィーム由来芽胞および浮遊菌由来芽胞を精製した。それぞれの芽胞の形態を位相差顕微鏡により観察したところ、いずれの株においてもバイオフィーム由来芽胞の方が長径が長いことが明らかとなった。また、芽胞の詳細構造を比較するために、*P. polymyxa*の芽胞の断面を透過型電子顕微鏡により観察したところ、バイオフィーム由来芽胞の方が最外層であるcoatが厚いことが示された。芽胞のcoat構造は過酢酸耐性に寄与することが報告されているため、その耐性を双方で比較した。その結果、バイオフィーム由来芽胞の方が過酢酸耐性が高いことが明らかとなった。さらに、両芽胞の発芽効率を観察したところ、バイオフィーム由来芽胞の方が発芽に要する時間が長いことが示された。また、*P. polymyxa*および*Paenibacillus sp.*は食品製造装置に広く用いられる材質であるステンレス上にもバイオフィームを形成し、その内部に芽胞を形成することが示された。以上より、*Paenibacillus*属細菌のバイオフィーム由来芽胞と浮遊菌由来芽胞は性質が異なり、より高い耐性を有していることが明らかとなった。バイオフィーム由来芽胞のcoat構造および高い休眠性が、耐性向上に寄与することが示唆された。食品等の製造環境においては、*Paenibacillus*属細菌はバイオフィームを形成し、その内部に形成された耐性の高い芽胞が製品へ混入、残存する可能性が考えられた。

土屋 雄揮¹, 浅田 智也³, 廣田 絵理奈², 中尾 春香², 森崎 久雄^{2, 3}¹日大・生資, ²立命大・生命, ³立命大・院生命

バイオフィームは、水中の固体表面に普遍的に見られる微生物共同体で、多種多様な微生物の棲みかとなっている。我々はこれまで、1) バイオフィーム内の水（以下、間隙水とよぶ）中には、周辺水中に比べて数百倍以上高い濃度で低分子量の糖（グルコースやマルトースなど）が含まれていること、また、2) それらの糖がバイオフィーム内の微生物の増殖に利用可能であることを明らかにしてきた。利用されるにも関わらず間隙水中から糖が高濃度で検出される要因として、バイオフィーム内で光合成により糖が生産（供給）されていることが推測された。本研究では、光照射により、バイオフィーム内の微生物や、間隙水中の糖の種類および濃度がどのような影響を受けるのか明らかにすることを目的とした。

2016年7月に、琵琶湖の赤野井湾で採取したバイオフィームの懸濁液をろ過滅菌（ $\phi 0.1 \mu\text{m}$ で2回）し、間隙水培地（5倍希釈相当）とした。微生物の接種源としてバイオフィーム懸濁液を培地に少量加え、明所（ $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）と暗所（ $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）でそれぞれ培養した（ 25°C 、120 rpm）。培養液を経時的に分取し（培養0、6、12、18、24、48時間）、細菌数測定（DAPI染色法）、群集構造解析（PCR-DGGE法）、糖濃度測定（フェノール硫酸法；グルコース換算）、低分子量の糖の同定（HPLC、カラム：COSMOSIL Sugar-D）を行った。

明所では、培養0時間から18時間にかけて菌数が増加し、糖濃度が減少した（低分子量の糖は検出限界以下にまで減少）。その後、培養48時間にかけて菌数はほぼ一定となり（ $2.8 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ ）、糖濃度（おそらく多糖と思われる）は増加した。一方、暗所では、明所と同様に、培養18時間まで菌数の増加および糖濃度の減少が見られたが、その後、菌数は明所よりも少ない値で一定となり（ $1.8 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ ）、糖濃度は減少を続けた。増殖した菌種を見てみると、約2/3は明暗条件で共通していたが、残りの1/3は各条件特異的であった。

以上の結果から、光が照射されると、1) 光合成により間隙水中に糖が生産され、2) その糖により、増殖する細菌の種類や活性が変化すると考えられた。今後、糖の生産に関与する微生物および生産される糖の同定を行う予定である。

山本 京祐^{1, 2}, 草田 裕之², 鎌形 洋一², 玉木 秀幸^{1, 2, 3}¹筑波大・生命環境, ²産総研・生物プロセス, ³東大・生セ

【背景・目的】日和見感染菌として知られる緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、幅広い表現型可塑性や迅速な進化によって宿主内から野外環境まで多様な環境において高い適応能力を示す。細菌の棲息環境の多くは空間的に不均一であるが、そうした不均一環境において緑膿菌は多細胞的生育形態であるバイオフィルム（BF）を形成することが知られている。BF 集団内からは BF 形成能の向上した進化株が出現することが実験的に示されているが、BF 形成と他の形質（運動性等）との間にはトレードオフがあることも示唆されており、BF の生活環（集合、増殖、離散）を繰り返す中でこうした進化株が実際に選択・維持されるのかという点や、適応過程へのその他の形質の寄与については不明な部分が多い。本研究では、モデル進化実験系を用いて不均一環境における緑膿菌の進化動態を精査することで、BF 形成やその他の形質が適応過程においてどのように変化し、維持されるかを明らかにすることを目的とした。【方法・結果】緑膿菌 PAO1 株を静置条件下で約 3 週間継代培養（24 時間ごとに攪拌・分散し、1 %（v/v）を新鮮培地に植継ぎ）することで、時空間的に不均一な環境条件で進化実験を実施した。PAO1 株は気液界面に BF を形成しながら生育し、培養開始 3～5 日程度でコロニー形態の変化した様々な進化株が現れ始め、その後集団内で優占化していった。複数の代表的な進化株について生理試験およびゲノム解析を実施したところ、表現型の変化は BF 形成能の向上と運動性（twitching）欠損に大別された。高 BF 形成株は徐々に集団内頻度が増加するのに対して、運動性欠損株は出現後急激にその頻度が増加し、より強い適応効果が示唆された。運動性に必要なピリ線毛は緑膿菌ファージの宿主細胞付着部位のひとつであり、運動性欠損株出現時に培養液中のファージ粒子濃度が大きく増加していたことから、BF 形成能向上だけでなくピリ欠損等によるファージ感染への耐性も適応過程において重要であることが明らかとなった。一方、実環境中では異種微生物と共存することが一般的である点を考慮し異種細菌 *Staphylococcus aureus* との共進化系においても同様に試験したところ、*S. aureus* との共培養系では緑膿菌単独培養系に比べて早い段階で運動性欠損株が現れるケースがみられたことから、種間相互作用が直接もしくは間接的に緑膿菌の進化動態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

千原 康太郎¹, 松本 慎也², 宮川 聡史¹, 常田 聡¹¹早大・先進理工・生命医科, ²名大・医・細菌学

【背景】ヒトの体内に形成されたバイオフィルムは慢性細菌感染症を惹起する。バイオフィルム関連感染症が慢性化する要因の一つとしてバイオフィルム内に潜む休止細菌の存在が挙げられる。休止細菌とは自ら分裂活性を抑制することで高濃度の抗生物質から生き残ることができる亜集団であり、抗生物質除去後に分裂を再開する。これまで、複雑な環境下にあるバイオフィルム中で休止細菌を検出することは困難であったが、バイオフィルムを効率よく抗生物質で除去するためには休止細菌の時空間動態解明が望まれる。【目的】我々は過去に、バイオフィルムの形成過程をシミュレートできる3次元個体ベースモデルを利用し、栄養源・酸素源枯渇といったストレスに対する休止細菌形成を再現した。本研究ではシミュレーション結果との比較解析のため、分裂活性を可視化するマーカー株を利用し緑膿菌コロニーバイオフィルム中の休止細菌の時空間動態を観察した。【方法】休止細菌を検出するために、細胞骨格Filamenting temperature-sensitive mutant Z (FtsZ)のN, C末にCFPおよびYFPをそれぞれ融合した分裂活性マーカー株を構築した。FtsZは、非分裂時は個々の分子が一定の距離を保ち細胞膜上に存在するためCFP励起光に対しCFP蛍光を示す。一方、分裂時は分裂面で重合するため蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるYFP蛍光を示す。構築したマーカー株を用いて、コロニーバイオフィルムを形成させ、抗生物質処理前後のバイオフィルム中の休止細菌の局在を経時的に取得した。【結果・考察】コロニーバイオフィルム観察の結果、底部でのみFRETによるYFP蛍光（分裂細菌）が観察され、頂部ではCFP蛍光（休止細菌）のみ観察された。また、オフロキサシン処理後のコロニーバイオフィルムでは頂部の休止細菌のみ生存し、回復培養後では底部で休止細菌が観察された。我々は抗生物質処理前後の休止細菌局在変化はコロニーバイオフィルムの厚さに依存していると予想した。抗生物質処理前のコロニーバイオフィルムの厚さは30 μm 以下であり、底部の細菌は活発に分裂することができるが、頂部の細菌の分裂は底部から供給される栄養源の枯渇により抑制される。抗生物質処理後のコロニーバイオフィルムの厚さは30 μm を超えており、底部の低酸素状態により生じる休止細菌が栄養を消費しなくなるので頂部まで栄養が行き渡り、頂部の細菌の分裂活性が復活すると予想される。

高木 善弘, 平山 仙子, 阿部 真理子, 津田 美和子
海洋研究開発機構

海洋におけるメタン酸化細菌群は、その炭素循環において重要な役割をなすが、その分離培養された例は少ない。我々は、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ている。本培養では、メタンを唯一の炭素源として連続的に供給することにより、単一種類のメタン酸化細菌を一次生産者とした複合系のバイオフィルムを形成した。そこで、細菌群種構造、複合系に於けるメタン酸化細菌の役割を明らかにするため、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。その結果から、バイオフィルムには、メタン酸化細菌の存在比が2—3割であるのに対して、発現リボソームRNAは、全体の80%以上を示し、さらにメタン酸化及び同化関連遺伝子が高発現していた。発表では、バイオフィルムといった複雑系においてもオミックス的アプローチが有効であることを示し、バイオフィルムに於けるメタン酸化細菌の役割についても考察する。

梅津 将喜¹, 簾内 崇彰², 福田 康弘¹, 中井 裕¹, 高橋 英志², 多田 千佳¹¹東北大・院・農, ²東北大・院・環境科学

メタン発酵は有機性廃棄物からバイオガスを抽出する技術であり、環境に優しい廃水処理法として普及が進んでいる。一方従来のメタン発酵は、メタン菌の増殖速度の遅さから立ち上げに時間がかかり、発酵槽内のメタン菌が流出するため発酵効率の低下が課題となっている。そのため、メタン発酵槽内にメタン菌を高密度に保持し続けることが重要であり、炭化材やガラス、樹脂などの担体を利用した固定技術や、メタン菌の付着特性の解明が行われている。しかし、メタン菌が疎水性表面を持つ担体に付着し易いという通説に対し、親水性表面に多く付着するといった相反する報告(Nguyen *et al.*, 2016)もあり、メタン菌の付着メカニズムは未だ不明である。本研究では、炭素フェルトに対し11種類の化学処理を行い、高温性水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* strain ΔHの付着量を、化学処理の違いによって比較し、その付着特性を解明することを目的とした。カーボンフェルトに対し、精製水を含む11種類の溶液(NaOHやH₂SO₄など)で100℃、6時間還流し処理担体を作成した。これらの処理担体をΔHの培養液に入れ、メタン菌付着量の比較を行った結果、11種類の処理担体のうちNaOH処理担体において最も多くのメタン菌が付着していることが分かった。16S rDNAを標的にした定量PCRの結果、NaOH処理担体上には精製水処理担体の約3.7倍のメタン菌が付着しており、顕微鏡観察においてもNaOH処理によってメタン菌付着量が明らかに向上していることが明らかになった。今後は処理担体の表面性状を解析し、メタン菌付着量との関係を調査することで、メタン菌の付着に関係する因子の特定を行う。

宮崎 俊¹, 清川 達則¹, 尾花 望², 別役 重之², ANDREW SHINICHI UTADA², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境系

バイオフィーム (BF)は医療や産業分野などに関わる様々な環境で見出される複雑な構造体である。微生物が固体表面上に付着して形成されるその構造体は、細菌と細菌自身が産生する細胞外マトリクスによって構成される集合体であり、環境中では多くの細菌はこのBF状態で存在している。また、BFという3次元構造体を形成することで、微生物は様々な環境ストレスに耐性を獲得することが知られている。さらに、BFは金属腐食、う蝕、バイオフィアウリングなどの主要な原因となり、人にとって負の側面をもたらす一面もある。このように、BFは我々の生活において深くかわることから、その形成メカニズムへの深い理解は不可欠である。BFの多くはその基質となる固体表面上に作られることから、その形成には物質表面の性質が大きく関与することが知られている。とくに物質表面の化学的な性質、例えば、疎水性や親水性、電荷に着目した研究は盛んにおこなわれてきた。しかしながら、基質表面の性質は化学的なものだけでなく、その構造などの物理的側面もBF形成に大きく関与しうることが考えられる。そこで、我々は表面構造とBF形成の関係性の解明を目的に、任意の基質表面構造の構築と、その表面上におけるBF形成の解析を行った。様々な基質表面の構築には、シリコンの一種であるpolydimethylsiloxane (PDMS)による自在な表面構造形成を可能とするフォトリソグラフィー技術を用いた。PDMSは生体毒性が低いことから、細菌動態の研究において一般に用いられている。様々な表面構造がE. coli K-12株BF形成に与える影響の観察を行ったところ、基質表面構造が、そこに定着・生育する菌体の密度に影響を与えることが明らかとなった。以上のことから、BFの基質表面構造という物理的な特徴によって、細菌のBF形成が制御されうる可能性が示唆された。本発表ではその解析結果を報告する。

滝本 祐也, 石田 孝弥, 幡本 将史, 山口 隆司
長岡技大・院

膜分離活性汚泥法 (Membrane bioreactor: MBR) は、単一槽で生物学的処理と固液分離を行うことができるため、従来の活性汚泥法に代わり排水処理プロセスへの適用がすすめられている。しかしながら、経年の膜の利用により発生する膜の詰まり (膜ファウリング) がMBRの普及を妨げる要因の一つとなっており、未だに膜ファウリングの解消方法は確立されていない。膜ファウリングは可逆的ファウリングと不可逆的ファウリングの2種類に大別でき、後者は膜にバイオフィームが付着することで深刻化する。膜ファウリングの原因物質としては、微生物由来の細胞外ポリマー (Extracellular polymeric substances: EPS) および溶解性微生物代謝産物 (Soluble microbial products: SMP) 等が考えられているが、詳細な成分等は未解明のままである。加えて、膜ファウリング発生に大きく寄与するバイオフィーム内の微生物種に関する知見も少ない。したがって、膜ファウリング制御のためにはバイオフィームを形成する微生物種の特定を行うことが重要である。そこで本研究では低有機物負荷で無酸素/好気MBRを運転することで膜ファウリングを発生させ、膜ファウリングおよびバイオフィーム形成に関与する微生物の推定を行った実験には2台のラボスケール無酸素/好気MBRを用い、実下水を供給した。膜ファウリングの発生は膜間差圧 (Trans membrane pressure: TMP) を指標とした。膜ファウリング発生後、膜に付着したバイオフィームを採取し、16S rRNA遺伝子に基づく微生物群集構造解析を行った。実験の結果、低有機物負荷開始7日目に膜透過水のリン濃度の上昇および脱窒率の低下が確認され、15日目に急激なTMPの上昇が発生した。このことから、低有機物負荷により膜ファウリングが発生したと考えられた。膜面に付着したバイオフィームの微生物解析を行った結果、門レベルで未培養のTM6門細菌が優占して検出された。検出されたTM6はリアクター内汚泥からはほとんど検出されず、バイオフィームに特異的に検出されたことからバイオフィームを形成する微生物種であることが考えられた。以上より、MBRの低有機物負荷運転に伴い発生した溶菌が膜ファウリングを進行させ、膜面に付着したTM6門がバイオフィーム形成に関与することが推察された。

田淵 大樹¹, 瀧原 速仁², 砂入 道夫¹, 岩淵 範之¹¹日大・生資科・応生科, ²新潟大院・医

【目的】 *R. erythropolis* PR4株は、アルカンとの相互作用が極めて特徴的であることが明らかにされている。同菌は培地/アルカン二相培養系において、アルカンの炭素数によって、水/アルカンの界面に菌体が吸着する「吸着型」、あるいは水相に接種した細胞がアルカン相内に転移して生育する「転移型」というように、局在性を変化させる極めて特徴的な挙動を示す。また、後続の研究でPR4株は、無機塩培地(NP培地)と*n*-ドデカン(C12)の二相培養系において、MgSO₄を添加する量、時期を調節することにより、上述した細胞の局在性を意図的に制御(吸着から転移へ、あるいはその逆など)できることが示唆されている。本現象は、PR4株を利用する上で非常に重要な要素であるが、MgSO₄がこのような現象を引き起こす原因は未だ不明である。本研究では、MgSO₄による細胞の局在性変化の機構を解明することを目的とし、各種解析を行った。【方法および結果】まず、*R. erythropolis* PR4株をNP+C12培地 (0.5 g/Lの(NH₄)₂SO₄、0.5 g/LのK₂HPO₄、5% (v/v)のC12)に接種し、MgSO₄の添加の有無や添加時期を変化させて、培養し、局在性を検討した。その結果、MgSO₄添加条件では、培養初期から実験終了時まで一貫して吸着を示し、一方で細胞MgSO₄添加条件では転移を示していた。次に、同条件でのコロニー数の推移を検討したところ、MgSO₄添加条件に比べ、無添加条件の方が約10倍高かった。これは、転移の条件の方が良好な生育を示すというこれまでの傾向と一致した。続いて、培養の途中でMgSO₄を添加した場合の影響を検討した。その結果、MgSO₄を添加した時点から細胞の局在性が吸着に変化し、その後培養終了時までその状態を示した。また、同時にコロニー数が低下し始め、最終的には無添加条件と比べ、約1/100に低下した。これらの結果は、MgSO₄の添加がNP+C12培地での生存を抑制しているように見受けられた。これらの結果を確認するため、各条件によるCTC染色を行ったところ、MgSO添加条件では、吸着を示す細胞において高い呼吸活性が確認されたが、無添加条件では、高い呼吸活性が見られなかった。

塩田 拓也, 田代 陽介, 新谷 政己, 二又 裕之, 金原 和秀
静大院・総合科技

細菌は細胞単体で生息する浮遊状態や、固体表面上に付着し増殖することで形成するBiofilm (BF) 状態など、様々な形態をとって存在している。実環境中においては、細菌はBF状態で生息することも多く、浮遊状態とは異なる遺伝子発現や生理学的性質を示すことが知られている。一方、微生物の膜表層から分泌されるベシクルは、サイズが20~200 nm、リン脂質二重層のリポソーム様構造体であり、DNAやタンパク質などを内包して輸送することにより、細胞外情報伝搬媒体として機能している。しかし、ベシクルの形成機構や特性についての知見は浮遊状態の細菌由来のものが大半であり、実環境中の細菌がどのような特性のベシクルを分泌しているか不明である。そこで、様々な環境で分泌されるベシクルの機能や、生理学的特徴について理解する必要がある。本研究は、外部環境変動とベシクルの特性との関係性を明らかにすることを目的とした。BF研究のモデル微生物である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株を供試菌株として用い、浮遊条件として液体振盪培養、BFが形成される条件として液体静置培養、固体静置培養の三条件を設定した。各培養条件で分泌されるベシクルを超遠心分離によって回収し、FM4-64の蛍光強度を測定してベシクル形成量を比較した。また、ベシクルのタンパク質組成をSDS-PAGEで比較した。菌体及びベシクルからリン脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分離後、定量化することでリン脂質組成を比較した。各培養条件のベシクル形成量を比較したところ、液体静置培養において他の条件と比べて10倍ほど高い値を示した。各培養条件のベシクルのタンパク質組成は異なったため、細菌の外部環境が異なると分泌されるベシクルの特性も変化することが示唆された。一方、液体静置培養の菌体は全リン脂質中のカルジオリピン (CL) の割合が高いことが示された。さらに、分泌されるベシクルについてもCLの割合が高いことが示された。CLはリン脂質のホスファチジルグリセロールが二つ連なった構造をしており、極度に湾曲していることから、他のリン脂質とは異なる構造や特徴を持つ。しかし、ベシクル形成とCLの高濃度化や局在化との因果関係については不明である。今後、さらにCLとベシクル形成機構及び特性の関連性を明らかにしていく。

川村 優樹¹, 渡辺 宏紀², 清川 達則¹, 八幡 穰², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境科学研究科, ²筑波大・生命環境系

(背景)

これまで環境微生物の識別には16srRNA配列解析やFISHなどが用いられてきたが、微生物の種や代謝状態などをその場で、染色などの処理を施さずに（つまりintactな状態）で判別できる手法はこれまで存在しなかった。

(目的)

我々は最近、自家蛍光パターンを目印として異なる性質をもった細胞を見分ける新しい手法「Meta-Spectral Imaging法」を開発した。細胞内のタンパクや代謝産物は様々な種類・強弱の自家蛍光を発しており、それらを総合した自家蛍光パターンは細胞の種類を表現する“指紋”として機能する。自家蛍光パターンに潜在する細胞ごとの特徴を人間が認識することは難しいが、画像分析を用いることで高精度の識別を可能にした。

(内容)

今回の発表では、酵母や細菌における自家蛍光パターンの取得と、それらの間に存在する違いについて報告する。細胞の空間位置情報を精密に取得するCOCRM法（当研究室で以前開発した共焦点反射顕微鏡法）を同時に使用するメソッドについても報告する。

(展開)

この方法では細胞に備わる自家蛍光を利用するため、蛍光タンパク質発現遺伝子の導入や染色といった特別な処理は必要ない。微生物の識別が飛躍的にシンプルになることにより、臨床検査、基礎研究、産業応用などの現場でブレイクスルーがもたらされることが期待される。

飯田 千里¹, 山村 茂樹², 天知 誠吾¹¹千葉大学院 園芸学研究科, ²国立環境研究所

アンチモン(Sb)は多くの工業製品に利用されているが、毒性があり近年汚染物質として問題視されている。我が国においても旧Sb鉱山周辺の土壌や河川において指針値を超過したSbが検出されている。Sbの酸化数は主に3価と5価を取り、毒性や吸着性はpHや酸化数に依存することから、化学形態に着目した挙動の解明が必要である。Sbの化学的な酸化還元には鉄鉱物やH₂O₂が関与しているが、最近になって微生物によるSbの酸化還元が注目されている。現在Sb(III)酸化細菌として65種の報告があるが、Sb(V)還元細菌に関しては2種の報告しかない。そこで本研究では、Sbの環境挙動に及ぼす微生物の影響を解明するため、汚染土壌からの新規Sb(V)還元細菌の単離を目的とした。旧Sb鉱山である兵庫県中瀬鉱山の旧抗口付近の土壌を接種源とし、酢酸を電子供与体、K[Sb(OH)₆]を電子受容体とした無機塩培地で嫌氣的に集積培養を行った。酢酸濃度をHPLCで、液相中のSb濃度をICP-MSで分析した。集積培養の結果、4日間で4.4 mMのSb(OH)₆⁻を消費し、それに伴って白色結晶を形成する集積系を確立した。SEM-EDSで結晶の定性分析を行った結果、Sb(OH)₆⁻が還元され生じたSb(OH)₃が脱水し、Sb₂O₃の結晶が沈殿すると推測された。さらにその集積系より加圧培養試験管を用いて0.4%寒天を含む培地中でコロニー化させ、Sb(V)還元細菌SbR株の単離に成功した。SbR株は5日間で4.3 mMのSb(V)及び1.7 mMの酢酸を消費し生育した。16S rRNA遺伝子に基づく系統解析の結果、SbR株は*Pelobacter propionicus*と97.5%、*Geobacter chapellei*と96.9%相同であった。また既知のアンチモン還元細菌と系統的に近縁でないことから、新規の異化的Sb(V)還元細菌の単離に成功したと考えられた。SbR株はSb(V)の他に電子受容体としてFe(III)、硝酸、AQDS、電子供与体として酢酸、乳酸、ピルビン酸を利用できたが、乳酸やエタノールを発酵代謝できなかった。従ってSbR株は嫌気発酵細菌である*Pelobacter*属ではなく*Geobacter*属細菌により近縁であると推察された。

梅澤 和寛, 小島 久弥, 福井 学
北海道大学低温科学研究所

微生物学的硫黄不均化反応は、硫黄酸化や硫酸還元と同様に地球上の硫黄循環に関与すると考えられている。硫黄不均化細菌は、系統的に硫酸還元細菌に近いものが知られているものの、限られた系統でしか報告されていない。系統的に新規性の高い硫黄不均化細菌を探索する目的で、定山溪温泉（北海道）のバイオマットをチオ硫酸不均化の培地に接種し、45°Cで培養を行った。数回の継代培養後に、Illumina MiSeqを用いた16S rRNAに基づく微生物群集構造解析を行った。類似度97%でOTUに分類すると全リードの99.4%が単一のOTU(以下45Jとする)であった。同じDNA試料をもとにPacBioを用いてゲノム配列を解析した結果、45Jに由来する長さが約2.4M bpのコンティグを含むドラフトゲノムが得られた。45Jの生理学的特性を明らかにするために集積培養系の基質試験を行なった結果、二酸化炭素を炭素源としたチオ硫酸もしくは単体硫黄の不均化条件（硫化水素の除去に三価鉄を使用）で生育が認められた。しかし、水素、乳酸もしくはギ酸を電子供与体とした硫酸還元での生育は認められなかった。45Jのゲノム解析の結果、硫酸還元に必要な遺伝子である*aprAB*、*sat*、*qmoABC*そして*dsr*遺伝子群の全てが見出された。また、炭酸固定に関わる遺伝子として還元的アセチルCoA経路に関わる遺伝子が見つかった。45Jの16S rRNA配列相同性は最近縁種に対して88%であり、系統解析の結果Nitrospira門に属し、既存の種とは独立した系統に位置することが明らかとなった。また、湖底や地下水などを試料とした環境クローンが45Jの持つ16S rRNAと系統的に近縁であることが明らかとなった。これまでNitrospira門に属する硫黄不均化細菌は報告されていないが、上記の培養実験結果から45Jに近縁な環境クローンに由来する細菌は硫黄不均化細菌であると推測される。

平 大輔¹, 北村 龍史¹, 中村 照也², 山縣 ゆり子², 古川 憲治³, 藤井 隆夫¹¹崇城大・生命, ²熊本大・院薬, ³熊本大・院自然

窒素除去は、水処理の主要な課題の1つであり、窒素化合物の窒素ガスへの変換プロセスとして、嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）という微生物プロセスが応用されつつある。アナモックスの1つの特徴は、ヒドラジン（ N_2H_4 ）が反応中間体として合成されることである。 N_2H_4 は一酸化窒素とアンモニアから合成され、マルチ*c*型ヘム酵素であるヒドラジンシンターゼ（HZS）によって触媒されることが報告されているが、精製されたHZSタンパク質の分子活性は $20\text{ nmol}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{HZS-タンパク質}$ と低い。この低い活性は、*in vitro*アッセイにおける人工電子供与体の使用、またはヒドラジン合成に必要なとされる複合体が細胞破碎によって解離するためと考えられている。本研究では、別のヘムタンパク質であるヘテロ二量体シトクロム *c*（NaxLS）の存在下において、HZSの酵素活性値が少なくとも2桁増大することを報告する。さらにX線結晶構造解析によって、NaxLSがHZSとの比較的安定な過渡的複合体を形成し、それらの*c*型ヘム間の迅速な電子移動反応が可能となることを示す。これらの実験結果は、低い酸化還元電位を有するNaxLSが還元力を提供できる場合にのみ、 N_2H_4 が合成され得るというアナモックスにおける N_2H_4 合成の生理学的機構を提案する。

多胡 香奈子¹, 徳田 進一², 大久保 卓¹, 早津 雅仁¹¹農研機構・農業環境変動研究センター, ²農研機構・西日本農業研究センター

食料の安定生産のため、農耕地には多量の窒素肥料が投入されている。その結果、農耕地の微生物群集による窒素代謝作用が影響を受け、温室効果ガス一酸化二窒素（ N_2O ）の発生量が増加し続けている。一般的に農地では施肥や降雨時に高い N_2O 発生が観察される。その主要な発生源は土壌であるが、作物体やその残さによって N_2O の発生量が増加することや、収穫前後に多量の N_2O が発生するという報告がある。従って作物体も N_2O の発生に関与している可能性があるが詳細は不明である。

N_2O 発生には硝化と脱窒という2つの窒素代謝が関わっている。近年、土壌に生息する硝化菌や脱窒菌が植物体にも存在する可能性が示唆されていることから、植物体も N_2O 発生能を持つ微生物の窒素代謝に何らかの寄与があると考えられる。以上のことから本研究では、作物体の N_2O 発生への関与とそこに存在する微生物叢を明らかにすることを目的とした。

研究には施肥設計の異なるキャベツ栽培圃場（つくば市、農研機構）を使用した。この圃場では長年にわたり、牛糞堆肥＋化成肥料（慣行施肥）、無施肥、化成肥料、牛糞堆肥を連用している。これらの圃場について栽培期間を通じ N_2O 発生をモニタリングした。次に実験室内でキャベツの栽培・収穫時の環境を模したマイクロコズムを作成し、 N_2O が発生する状況を再現した。

N_2O が発生しているときのサンプルを回収し、葉と土を分けてそれぞれからの N_2O 発生量を測定した。 N_2O が発生している部位からDNAを抽出し、Miseqを用いて細菌の16S rRNA遺伝子に基づく多様性解析を行った。

キャベツの栽培期間に N_2O 発生をモニタリングしたところ、収穫期に高い N_2O 発生ピークが認められた。そのピークが最も高かったのは慣行施肥区であった。慣行施肥区から作物体と土壌を採取し、それらを用いてマイクロコズムを作成した。 N_2O のモニタリングを行ったところ、1週間程度で N_2O が発生した。一方、土壌のみのマイクロコズムからは N_2O が発生しなかった。以上から葉が N_2O 発生に関与していることが強く示唆された。次いで葉を回収してDNAを抽出し、細菌をターゲットにした多様性解析を行った。その結果、 N_2O が発生しているときの葉の微生物叢は N_2O が発生していない新鮮葉とは全く異なり、非常に高い多様性を示した。

齋藤 弥生¹, 青柳 智¹, 羽部 浩¹, 鎌形 洋一², 堀 知行¹¹産総研・環境管理, ²産総研・生物プロセス

硫酸、硝酸、亜硝酸、マンガンを電子受容体とした嫌氣的メタン酸化が報告されている。その中でも、地球の地殻内において4番目に豊富な元素である鉄を利用した本反応は、未培養分類群ANME-2dに属する古細菌によって触媒されることが近年発表された。しかし、鉄還元と共役したメタン酸化反応を担う微生物の多様性は十分に理解されているとは言い難い。一方、当研究グループでは、土壌や堆積物に広く存在するものの生物難利用性とされてきた結晶性酸化鉄が酢酸酸化と共役した微生物還元を受けることを見出し、さらにその微生物集積培養系の構築と系統解析を行ってきた。我々は、これまでに培ってきた結晶性酸化鉄を用いた集積培養法と、それによる解析データを利用することで鉄還元と共役した嫌氣的メタン酸化に関与する新規微生物の特定が可能と考えた。本研究では、メタンと結晶性酸化鉄を基質とした微生物集積培養系を構築し、系統的に特徴づけることを目的とした。森林、湿地、水田の土壌および用水路堆積物を植種源として用い、メタン (CH₄/CO₂ [95:5]) を電子供与体、結晶性酸化鉄 (hematite, magnetite, goethite, lepidocrocite) を電子受容体として、25°Cの嫌気条件下にて静置培養および緩やかな振とう培養を行った。培養は7年間継続し、その間に2回の継代を行った。132の全培養系から抽出されたDNAを鋳型に16S rRNA遺伝子のV4領域を標的としたPCRを行ったところ、114の培養系で遺伝子増幅（微生物の存在）が確認された。得られた全ての増幅産物を対象に次世代シーケンサーMiSeq (Illumina 社) による大規模塩基配列解読を行った。1つの培養系あたり3~8万種（合計で約580万種）の微生物を系統的に解析した結果、多種多様な微生物が培養系の構成種として検出された。このうち、既知の嫌氣的メタン酸化菌であるANME-2d古細菌や*Nitrospirae*門に属する新規細菌が、多くの培養系で高度に集積されていた。現在、本解析で得られた微生物種の系統データを、これまでに蓄積してきた酢酸による集積培養系のデータと比較し、その差分を検出することにより、結晶性酸化鉄の還元と共役した嫌氣的メタン酸化を担う微生物種の推定を行っている。

青柳 智^{1,2}, Cuong Tu Ho³, 成廣 隆⁴, 眞弓 大介⁵, 尾形 敦¹, 羽部 浩¹, 堀 知行¹
¹産総研・環境管理, ²石巻専修大, ³VAST, ⁴産総研・生物プロセス, ⁵産総研・地図資源

【目的】湿地は主要な大気メタン放出源のひとつであるが、笹に侵食された区域ではメタン生成が抑制される。酢酸は嫌気有機物分解過程において重要な中間代謝産物であり、そのほとんどは酢酸資化性のメタン生成菌により利用される。その一方で、一部の酢酸は二酸化炭素へ嫌気的に酸化されることが示唆されている。この反応を担う嫌気酢酸酸化微生物は、酢酸をめぐるメタン生成菌と競合関係にあり、メタンの放出を抑制すると考えられている。しかしながら、吸エルゴン反応である嫌気酢酸酸化を担う微生物の存在はほとんど分かっていない。本研究は、超高感度stable isotope probing (SIP) によりメタン生成菌と基質競合する嫌気酢酸酸化微生物の同定を目的とした。

【方法・結果】笹侵食湿地土壌を滅菌水へ嫌気的に懸濁し、¹³C標識酢酸5 mMまたは非標識酢酸5 mMを添加した後、25℃暗所で培養した（それぞれ¹³C標識系、非標識系と定義する）。両培養系において、添加した酢酸は培養開始後次第に減少し、4週間後にはほぼ全て分解された。¹³C標識系では培養期間中、¹³CH₄および¹³CO₂の生成が検出され、¹³C酢酸の分解によるものと示唆された。培養2週間後の土壌から抽出したRNAを超遠心により密度ごとに分離・分画し、密度画分に含まれるRNAを対象に、16S rRNAに基づく次世代シーケンサー解析を行った。¹³C標識系と非標識系から得られた高密度画分（浮遊密度：1.792–1.801 g/ml）における微生物群集構造を比較した。その結果、¹³C標識系において有意に相対存在量が増加した微生物、即ち¹³C酢酸を分解し取り込んだ微生物が36種検出された。そのうち2種は酢酸資化性メタン生成菌である *Methanosaeta* 属の古細菌であった。嫌気酢酸酸化微生物としては、脱ハロゲン化呼吸能を有する *Dehalogenimonas* 属に近縁な細菌が検出されたが、その他の33種は既知微生物の16S rRNA遺伝子に対して低い配列相同性（77.8%–92.5%）を示した。一方、培養開始時の微生物群集構造を解析した結果、上記で検出された嫌気酢酸酸化微生物はいずれも0.15%以下の相対存在量を示し、土壌中の存在量は極めて小さかった。これらの結果から、笹に侵食された湿地において系統的に新規で希少な微生物群が嫌気酢酸酸化を担っていることを見出した。

荻 祐太郎¹, 松下 慎², 木村 浩之³¹静岡大・院総合, ²静岡大・創造院, ³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）からなる。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の地下温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（古第三紀に付加した四万十帯の三倉層群）に位置する川根温泉の大深度掘削井（深度1,148 m）にて、地下温水（温泉）と付随ガスを採取した。本掘削性は平成6年に構築され、現在まで継続して毎時38立方メートルの地下温水と毎時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、地下水の水温は約50℃と比較的高温であること、嫌気状態であることが明らかとなった。また、付随ガスの分析を行った結果、86%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の嫌気培養を行ったところ、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ことが明らかとなった。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が共生することによって、堆積層に含まれる有機物から生成されることが示された。さらに、付加体の地下圏微生物は高い活性を有しており、今現在においても、深部帯水層でメタンが生成されていることが示唆された。発表者は、付加体の温泉付随ガスと地下圏微生物を対象とした基礎研究をもとに、島田市（静岡）および設備会社と連携して“川根温泉メタンガス発電システム”を構築した。ここでは、付加体の地下圏微生物によって生成されたメタンを利活用した地産地消エネルギー生産事業についても紹介する。

渡辺 涼介¹, 高橋 智¹, 賀川 一郎², 木村 一平², 羽部 浩³, 布施 博之²¹芝工大・院, ²芝工大, ³産総研

【背景・目的】硫化メチル(DMS)は悪臭物質である一方、特に海洋で発生するDMSは大気経由の硫黄循環の主要な経路であるとともに、雲の発生を介した気候変動への関与が示唆されている。我々の研究室では、DMS分解微生物の性状と自然界での役割について研究を行ってきた。前回の微生物生態学会において高橋らが、Methylophaga属に近縁な海洋性のDMS資化性菌の、SF-AQU株・Na-w株・SAN-WE株の3株について、硫黄酸化酵素であるSox系の遺伝子を持っていることや、SF-AQU株についてその菌学的性状について報告した。今回は、これらの株の硫黄代謝についてその代謝産物と遺伝子の発現、他の2株の性状等について報告する。【方法】菌の主な生育基質としては、DMSもしくはその酸化生成物であるDMSOを用いた。DMSOからの代謝産物の測定では、DMSOは塩化チタンで還元した後ガスクロマトグラフィーで、硫酸イオンは田中らの比濁法、チオ硫酸とテトラチオネートは、Kellyの方法に従い測定を行った。そして、RT-PCR (Reverse Transcription -PCR) については、RNeasy Mini kit (QIAGEN)とPrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2(TaKaRa)を用いて行った。【結果・考察】代謝産物の測定では、3株いずれも、5 mM のDMSO濃度が1 mMまで減少し、硫酸イオンが4 mMに増加した。チオ硫酸やテトラチオネートは検出されず、DMSに関しては、最大で数十 μ M程度の微量が培養途中に検出されたが、メタンチオールと硫化水素は検出されなかった。M.sulfonivoransやM.aminisulfidivoransはDMSを炭素源として代謝し最終代謝産物としてチオ硫酸を生成することが報告され、さらに同属のM.thiooxydansはチオ硫酸からテトラチオネートまで酸化することがRichらより報告されているが、我々の分離した3株では、DMSOからDMSを中間代謝物とし、硫酸を最終代謝物として生成していた。3株ともSox系硫黄酸化酵素遺伝子に関して、soxC,D,X,Y,Z,A,Bのクラスターとそれとは別にsoxY,Z のクラスターを有していたが、DMSOで培養したNa-w株についてRT-PCRを用いた発現解析を行ったところ、後者のクラスターのみ発現が確認された。また、3株のうちSAN-WE株のみが炭酸固定系の遺伝子を有していることから、その働きについても解析を行っていく予定である。

細田 至温^{1, 2}, 西嶋 傑^{2, 3, 5}, 福永 津嵩^{1, 4}, 服部 正平^{3, 5}, 浜田 道昭^{1, 2, 6}

¹早稲田大学大学院 先進理工学研究科 電気・情報生命専攻, ²産総研・早大 生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ (CBBD-OIL), ³東京大学大学院 新領域創成科学研究科, ⁴日本学術振興会特別研究員, ⁵早稲田大学 理工学術院 先進理工学研究科, ⁶日本医科大学 医学研究科

近年のNGS技術の発達により、環境中から直接微生物のゲノムをシーケンシングするメタゲノム解析が盛んに行われるようになった。その結果、人間の健康と腸内細菌には重要な関係があることが明らかとなりつつある。一方で、先行研究は主に微生物集団の組成に注目しており、種の共起関係についてはあまり着目されてこなかった。種の共起関係を表す指標として相関係数が用いられてきたがメタゲノムの組成データに相関係数を用いると偽相関が現れてしまうことが指摘されている。この研究では自然言語処理において単語の共起関係を推定する手法であるトピックモデルをメタゲノムデータに適用した。文章を構成する単語がトピックという潜在変数から生成される確率モデルがトピックモデルである。このトピックモデルから求められるトピックは共起しやすい単語を確率値で示す。そこで、メタゲノムのデータの構造を文書を環境、トピックを種の共起関係、単語を細菌種としてモデル化しトピックモデルを適用した。学習アルゴリズムとしてギブスサンプリングを用いた。0-84歳、BMI約14-約30の範囲に分布する12カ国の健康な被験者の腸内細菌のメタゲノムをシーケンシングし種の組成比を算出したデータを利用した。結果として、ペルー・マラウィ・ベネズエラといった発展途上国の人の腸内でよく見られるとされるPrevotella属やAlistipes属の細菌は3トピックに固まっていたが属ごとに別れていた。また、日本人に多いとされるBlautia属とBifidobacterium属も同様に別のトピックに推定された。しかし、Blautia属の中でRuminococcus gnavus種は別のトピックで強く推定されていた。

神沼 英里¹, 藤澤 貴智¹, 林 史¹, 西澤 達也², 中村 保一¹, 小笠原 理¹
¹遺伝研・生命情報, ²情報数理バイオ

NGS由来大規模配列データは、論文公開と共に、国際塩基配列データベースとして日本DNAデータバンク(DDBJ)等から公開されている。国際塩基配列データベースの様な大規模オープンデータは、機械学習モデリングの素材として活用することができる。一方、環境微生物研究に有用な携帯型DNAシーケンサの配列登録が増えて来ている。携帯型に加えて実験装置も簡便化してくると、今後、非専門家が野外調査などで環境微生物実験を行いデータバンクに配列登録を行うケースが出てくると考えられる。専門家がDNA配列に注釈タグを付与する現状では、注釈精度は一定の品質を保っている。しかし、非専門家の注釈付が普及してくると、入力間違い等の原因で、データセット全体の注釈精度が低下する可能性が考えられる。この問題の対策として、機械学習によりDNA配列の注釈タグ属性値を事前に予測しておき、非専門家を含む登録者へ予測注釈候補を推薦する方法

(DNASmartTagger)を提案する。DNASmartTaggerでは、オープンデータのDNA配列注釈情報を収集して、注釈タグ属性値を予測する機械学習モデルを構築する。DDBJではNGS生配列の試料注釈はBioSampleデータベースに記載されており、452種類の注釈タグがある。またINSDC TradのFeature/Qualifier Keysデータにも注釈情報が蓄積されている。Qualifier Keyの種類は89である。BioSampleデータベースは近年スタートしたので、Tradの方が運用歴が長い。この為、本研究ではINSDC Qualifier Keyの/altitudeタグを生態学関連属性として、Pilot研究を行った。INSDCデータベースからPLN DivisionでFungiキーワードと/altitudeの検索条件で訓練データを作成した。入力配列は5'末端fragmentとk-mer頻度の2種類を試みた。予測対象の高度は定量値を、高・中・低の3つのカテゴリデータに変換してSupport Vector Machine(SVM)分類器を構築した。5,831配列に対して交差検証条件でのSVM予測精度はAUC評価指標で0.79 (fragment), 0.87 (5-mer)だった。ポスタでは、汎用タグである/PCR_primersの予測結果についても紹介する。

平井 美穂, 西 真朗, 津田 美和子, 高木 善弘, 布浦 拓郎
海洋研究開発機構

メタゲノム解析技術はもはや汎用的な解析技術と言えるが、試料採取機会や採取量の限られた試料からのショットガンシーケンスライブラリー構築には、技術的課題が存在する。例えば、我々の研究においては、深海試料から回収された極微量なDNAを対象とする場合、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により、汎用的な技術をそのまま適用することは困難である。

本研究では1 ng以上のDNAを推奨する市販キット「KAPA Hyper Prep Kit」(KAPA HP)を用い、推奨濃度限界 (1 ng DNA) 以下の環境DNAを起点としたライブラリー構築手法を検討すると共に、Rinkeら(2016)により報告された「Nextera XT DNA Library Preparation Kit」(Nextera XT)によるシーケンスライブラリーも構築し、それぞれによって得られたシーケンスデータの比較検討を試みた。なお、試験試料として深海底堆積物、表層海水由来の微量環境DNA (1 pg-1 ng) を用い、環境DNA中の夾雑物のライブラリー構築に与える影響も評価した。その他、一部の試料については、Ovation SP+ Ultralow Library System (Ovation SP+) によるライブラリーも比較検討に加えている。

ライブラリー構築条件や環境DNAの抽出等に関する条件を行い、全ての環境DNAにおいてKAPA HP、Nextera XTの両キットにて、極微量の環境DNA(1 pg)から十分に解析可能なシーケンスを得ることに成功した。但し、1 pgから構築したライブラリーにおいては、ややPCR duplication readと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増える傾向が認められている。更に、得られたリードのGC含量、kmer、群集構造について比較検討を進めた結果、キット毎のライブラリー構築時のゲノム断片化手法の違いが、初発DNA量の違いよりも得られるデータに与える影響が大きいことが示された。一方、1 pgの環境DNAから構築したライブラリーは、いずれのキットを用いた場合も10 pg以上の同じ環境DNAから構築されたライブラリーとやや異なる性質を示し、1 pgまで初発DNAが減少すると、ゲノム増幅がライブラリー組成の偏りが大きくなることが明らかになった。本研究の結果は10 ng以上の環境ゲノムを初発とすると、いずれのキットを用いても十分な結果を得ることが出来ることを示す。本発表ではこれらの結果と合わせ、ピコグラムレベルの環境DNAを扱う上での実験テクニックについても紹介する。

寺田 武志¹, 諸野 祐樹², 星野 辰彦², 鈴木 剛人³, 佐藤 卓広³, 湯浅 久史³, 久保田 裕仁³, 稲垣 史生²

¹株式会社マリン・ワーク・ジャパン, ²JAMSTEC・高知コア研, ³興研株式会社

【目的】近年、分子生物学的技術の発展により、単一微生物細胞から得られた極微量なゲノムDNAからも遺伝子の増幅が可能となっている。一方で、実験環境からのDNA汚染は、遺伝子の増幅効率が上がるに従い顕著な問題となってくる。一般的に環境のクリーン度は0.1-0.3 μm 程度の粒子の存在数によって定義されるが、それよりもサイズの小さい浮遊DNAについては、これまで明確な汚染評価がされてこなかった。本研究では、人工的にDNAエアロゾルを発生させ、汚染DNAの濃度を定量することで、クリーン実験空間内外でのDNA汚染レベルの評価を実施した。【方法】クリーン空間を保持する装置として、オープンクリーンシステムである興研株式会社製「テーブルコーチ」を用いた。モデルDNAとしては入ファージ由来のDNA断片を用い、濃度を段階的に変えたDNA溶液を含む容器中でバブリングを行うことでエアロゾルを発生させた。エアロゾル中のDNA分子量は時間当たりのDNA溶液量の減少から計算した。テーブルコーチの前後に384ウェルプレートを設置し、30分間暴露することによってトラップさせた汚染DNAを特異的プライマーによって定量した。【結果と考察】エアロゾル発生中の空気をサンプリングし、粒子分析装置により分析を行ったところ、DNA存在の有無によって空気中の粒子サイズ、存在量の分布に変化は認められなかった。また、DNAの暴露実験を様々な条件で行ったところ、テーブルコーチ装置前で、検出用プレート面積あたり約500 DNA分子が30分間の暴露で通過する条件からモデル汚染DNAが検出され始め、 5×10^6 分子が通過する条件では384ウェルすべてで汚染DNAが検出された。一方、 5×10^6 分子が通過する条件におけるテーブルコーチ装置後流（クリーン空間）では、プレート上で2ウェルにおいて汚染DNAが検出されるのみで、それより低濃度のDNAエアロゾル条件では汚染DNAが検出されなかった。従って、テーブルコーチにより粒子分析装置で検出が出来ないレベルのエアロゾル状DNA分子が効果的に補足されることが明らかとなり、浮遊DNA分子の汚染も排除した分子生物学的クリーン実験空間が構築されることが明らかとなった。

萩原 達也¹, 川上 周司², 山田 剛史¹¹豊橋技術科学大学 環境生命・工学系, ²阿南工業高等専門学校 創造技術工学科 建築コース

現在、生物学的廃水処理プロセスは物理化学的指標に基づき運転・管理が行われており、プロセス内の微生物は半ばブラックボックス的存在として扱われている。プロセスの運転・管理を適切に行うためには、物理化学的指標に微生物指標を加えた相互補完的な運転・管理法の導入が望ましいと思われる。微生物指標の導入には、処理現場にて簡便・迅速に標的微生物を計測する技術が必要であるが、上述した要件を満たす計測技術は存在しないのが現状である。そこで本研究では、5-cyano-2,3-ditoly-2-tetrazolium chloride (CTC) 法による微生物生菌の識別と機能性核酸分子 (以下、DNA アプタマー) による微生物種の識別を行う新たな微生物生菌数の計測原理を考案した。当該計測原理に基づく微生物計測技術を構築するため、本研究では、生物学的廃水処理プロセスにおいて重要な反応を担うアンモニア酸化細菌 (AOB) を標的とした。しかし、これまで CTC 法が、AOB 生菌数計測に応用された事例はなく、AOB を特異的に識別できる DNA アプタマーの報告例も知られていない。そのため本研究では、CTC 法による AOB 最適検出条件の決定と AOB の細胞表層タンパクに特異的に結合する DNA アプタマーの探索を目的とした。本研究では、*Nitrosomonas europaea* を対象微生物とした。CTC濃度やCTC反応時間をもとに、*N. europaea* の CTC 最適条件を決定したところ、CTC 濃度 5mM、CTC 反応時間 3 時間の条件下において、CTC染色細胞数が最も高い割合を示すことが判明した。次に、Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) 法によって、ランダム 1 本鎖 DNA (ssDNA) ライブラリー (88mer) の中から AOB の細胞表層タンパクに特異的に結合する DNA アプタマーの探索を行った。4 回の Cell-SELEX 法を行った結果、*N. europaea* に特異的に結合する可能性のある ssDNA 断片を得ることに成功している。引き続き、Cell-SELEX 法の回数を重ねて *N. europaea* に特異的な ssDNA を濃縮し、最終的な DNA アプタマー候補の配列情報を獲得する予定である。

山口 剛士¹, 木村 圭祐², 川上 周司³, 武邊 勝道¹, 山口 隆司⁴¹松江高専・環境・建設工学科, ²松江高専・生産・建設システム専攻, ³阿南高専・創造技術工学科, ⁴長岡技科大・環境社会基盤工学課程

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、環境微生物を分離培養を介せず視覚的に検出できることから今日においても重要な手法であり、様々な場所で適用されている。しかしFISH法で得られる蛍光強度は、菌体内の16S rRNAの存在数に依存することから、16S rRNAの存在量が少ない微生物の視覚的検出が困難である。そのような微生物の視覚的検出には、蛍光増幅技術として酵素反応を用いたcatalyzed reporter deposition (CARD)-FISH法が適用されている。しかし、CARD-FISH法に用いる酵素は、通常のFISH法に用いるプローブよりも分子量が大きいため細胞内への浸透が困難である。また、細胞浸透性を向上させる細胞壁処理は、菌体によって効果が異なるため菌体ごとに最適化を行っているのが現状である。従って、従来の細胞壁処理が効果を示さない微生物が存在している場合、従来の技術では視覚的な検出が困難な場合が考えられる。そこで、我々は、酵素を用いない蛍光増幅技術としてhybridization chain reaction (HCR) 法を用いた高感度FISH法の開発を行った。しかし、得られる蛍光強度は、FISH法と比較して約10倍程度であった。そこで本研究では、蛍光強度を増幅させるために抗原抗体反応の代替技術であるclick chemistryに着目し、click chemistryとHCR法を組み合わせた新規高感度FISH法の開発を行っている。これまでに、click chemistryに用いるalkyneを標識させたプローブを16S rRNAに適用させ、高い特異性を有していることを明らかにした。次に、HCR法の伸長起点を有したプローブにclick chemistryに用いるazideを標識させ、click chemistryを行った。しかし、標的及び非標的微生物からも蛍光が得られた。その結果から、azideが菌体内に沈着している可能性、HCR法の伸長起点の塩基配列が非特異に交雑している可能性が考えられた。そこで、click chemistryに用いる触媒である銅の有無による検討を行った。その結果、銅を用いない系においてすべての菌体で蛍光が得られなかった。従って、銅イオンがTm値に影響を及ぼしていると考えた。現在、銅イオン濃度の最適化やブロッキング剤を使用する等の検討を行っている。本手法を開発することで、これまで検出が困難であった環境微生物の視覚的検出が容易になるだけでなく、回収技術と組み合わせることでsingle cell genomicsへの適用も可能であると考えている。

田中 重光, 佐藤 博文, 永尾 寿浩
阪技術研

現在、アルキルエーテル化合物は、溶媒、溶剤、界面活性剤として乳化・分散・洗浄など広範囲にわたって使用されている。一般に、エーテル結合をもつ化合物は、化学的に非常に安定で、生分解されにくい。そのため、アルキルエーテル化合物は、その使用量や応用範囲が拡大傾向にある反面、放出されたエーテル化合物の環境中への蓄積や、廃棄物処理にかかるコスト増加が懸念される。この点で、効率の良いエーテル分解菌の分離は、これら問題解決のための重要な課題の一つであると考ええる。ある標的物質の分解菌の分離には、集積培養法が用いられることが多い。実際に、既知のエーテル分解菌も、そのほとんどがこの方法で単離・性状解析されている。ただ、集積培養法は、ある特定の培養条件(この場合エーテル化合物を唯一の炭素源とする等)で増殖の良い微生物が分離できる長所をもつ一方で、当該条件では増殖の遅い微生物は淘汰されてしまう欠点もある。そこで本研究では、新たに蛍光基質を用いたエーテル化合物分解菌の分離法を検討することにした。まず、蛍光色素TokyoGreenとオレイルアルコールあるいはジヒドロフィトールをエーテル結合させた蛍光基質を作製した(HST026およびHST023)。各基質は、ジメチルスルホキシド溶液とし、UV照射下で蛍光が消光していることを確認した。次に、これら蛍光基質を含有するTSB寒天培地を作製し、土壌懸濁液を塗布した後、37°Cで数日間培養した。その結果、短時間のUV照射下で蛍光を示すコロニーが確認できた。蛍光を示したコロニーは再度TSB寒天培地にて画線培養を行い、各基質につき約10株を単離した。分離した株については、蛍光基質を含むTSB液体培地にて37°Cで数日間振とう培養を行った。その後、培養液上清を回収し、波長516nmの蛍光を測定した。その結果、蛍光基質HST026およびHST023について、それぞれコントロールと比較して明らかに蛍光が増加した株KS10およびKS23を取得することが出来た。現在、これら2株の各基質に対する分解様式を検討している。

青木 奈緒子¹, 真本 祐太¹, 折口 菜都希², 三宅 英雄¹, 田中 晶善¹¹三重大・院生資, ²三重大・生資

【背景・目的】微生物生菌数を計測する方法としては、コロニーカウント法、光学密度（OD）測定、ATP測定などが一般的であるが、これらの測定には一般に煩雑な操作が伴う。また、土壌微生物はその大半が培養困難微生物であり、増殖過程の測定は容易ではない。本研究では、増殖に伴う発熱を指標とする微生物熱測定法を用いて、嫌気性菌の増殖過程の自動測定と解析、および、土壌微生物増殖に対する農薬等の抑制効果とそのストレスからの回復過程の定量的評価を試みた。【方法・結果】微生物代謝に伴う発熱とその経時変化の自動計測には、24チャンネルからなる多試料等温熱量計を用いた。嫌気性菌である *Clostridium beijerinckii* および *Clostridium cellulovorans* を、グルコースまたはセロピオースを含む培地に加え、増殖に伴う発熱過程を嫌気条件下で測定した。並行してODとATP量を評価した。*C. beijerinckii* では、発熱量、OD、ATP量それぞれの高い相関が見られた。他方、凝集特性を示す *C. cellulovorans* では、OD値は不規則な経時変化を示したが、発熱量とATP量の経時変化には高い相関が見られた。これらの結果から、嫌気性菌や菌体が凝集する菌においても、熱測定法により増殖過程を簡便かつ精度よく計測できることが示された。この結果に基づき、土壌微生物の増殖過程に対する農薬等のストレス物質の影響、およびそのストレスからの回復過程の評価を試みた。三重大学農場の畑土壌試料に、種々の濃度の農薬2,4-D共存系で、炭素源としてグルコースを加え、増殖に伴う発熱過程を測定したところ、2,4-D濃度の増大に伴い、発熱ピークの低下やピーク時間の遅れなど増殖が抑制される様子が見られた。ストレスからの回復過程を調べるため、土壌試料に2,4-Dを添加した後、0～18週間の各時点で採取した土壌試料にグルコースを加えて熱測定を行い、また並行して16S rRNA遺伝子による菌叢解析を行った。その結果、熱測定法では農薬の影響から徐々に回復する傾向が示されたのに対して、菌叢解析では回復する傾向が見られなかった。このことは菌叢解析と熱測定法を併用することにより、ストレスからの回復過程を多面的に評価できることを示している。以上の結果から、熱測定法は様々な菌種を対象とした増殖過程の測定や土壌微生物活性の評価法として有望であり、環境評価の新規手法としての応用が期待される。

岩崎 弘夢¹, 野中 健一^{1, 2}¹北里大・院感染制御, ²北里大・生命研

【背景と目的】旧バツカクキン科糸状菌を中心とした昆虫寄生菌、線虫寄生菌、菌寄生菌は宿主に感染する過程で、宿主免疫機構を突破するために神経攪乱物質や免疫抑制物質などの物質を産出することが報告されており、創薬資源として注目されている。また、*Metarhizium* 属や *Beauveria* 属等を始めとした昆虫寄生菌、*Pochonia* 属等の線虫寄生菌は微生物農薬として世界的に広く使用されている。したがって、これら寄生菌は微生物農薬、化学農薬および医薬品等の開発資源として極めて重要である。

寄生菌は普段、主に土壌に生息しているが土壌から寄生菌のみを網羅的かつ選択的に分離する方法は未だに確立されていない。それ故に、従来の方法ではランダムに分離した糸状菌から選択的に絞り込まなくてはならず膨大な費用と時間を要している。そこで、本研究ではこの問題を打破する革新的な寄生菌分離法の確立を目指す。

演者は選択的寄生菌分離を行うために、宿主の構成成分に着目した。昆虫の表皮、線虫の卵の表皮、菌類の細胞壁は構成成分に共通してキチン質を含んでおり、これらの寄生菌（昆虫寄生菌、線虫寄生菌、菌寄生菌）は共通してキチン分解能を有しているため宿主体内に侵入、感染することができる。本研究では、これら寄生菌に共通したキチン分解能に着目し選択的寄生菌分離を目指した。

【方法と結果】本検討ではキチンを主成分とした培地を作成し、キチン質分解で生じたハ口を指標とすることで選択的寄生菌分離を試みた。まず、培地に使用するキチン質の素材（キチン粉末、キチンナノファイバーの2種）とキチン質濃度によるハ口形成への影響を検討した。検討の結果、1.0%キチンナノファイバー培地が最もハ口の鮮明度が高く、本培地を選択的寄生菌分離培地として採用した。次に採用した1.0%キチンナノファイバー培地を分離培地として使用し、土壌から糸状菌の分離を行った。寄生菌分離選択性を検討するために糸状菌の一般的な培地であるPDA培地と、全分離株に占める旧バツカクキン科の割合を比較した。結果、全分離株に占める旧バツカクキン科（昆虫寄生菌、線虫寄生菌、菌寄生菌）の割合はPDA培地で約1割、本培地では約5割と大幅な分離率の向上を示した。

佐藤 真則¹, 猪野 悠梨佳¹, 稲葉 重樹², 中桐 昭³¹NITE・特許微生物寄託センター, ²NITE・NBRC, ³鳥取大・菌類きのこ遺伝資源研究センター

凍結乾燥法やL-乾燥法の乾燥保存法は数多くの微生物に適用可能で長期保存性に優れるのはもちろんのこと、ある程度常温での保管にも耐えるため、災害等のリスクに対するバックアップとしても優れており、さらには運搬時においてコスト面や簡便性に優れることが大きな利点である。しかしながら、担子菌のように通常培養では孢子を作らない糸状菌については非常に限られた凍結乾燥法の先行研究の報告が数例あるのみで、長期保存性に関する報告はない。このような菌株について有効な乾燥保存法を開発することは、長期保存法の選択肢が広がるとともに、上記のような利点を活用出来ることから非常に意義があると考えられる。そこで我々は担子菌培養株を用い、L-乾燥法による乾燥保存法の開発を行ってきた。これまで我々は平成26年日本微生物資源学会においてパーライトを担体として前培養を行うことでL-乾燥後の生残率を向上させることが出来ること等を示した¹⁾が、現在の方法では長期保存法の確立には至っていないことと、実験データがばらつくといった課題がある。一方自然界では担子菌はしばしば乾燥状態にさらされているため、それに耐えるための機構を持っていると考えられる。そこで我々は緩慢予備乾燥処理によって本来担子菌に備わっていると考えられる乾燥耐性機構を働かせることでL-乾燥後の生残率を向上させることが出来るのではないかと考え検証を行った。方法は3.5cmシャーレにパーライト0.6gと液体培地0.2mLを入れ5株の試供菌株（オオウズラタケ、マンネンタケ、マイタケ、シイタケ、ハナビラタケ）を約20日間培養し十分な増殖が確認された後、菌糸の入ったシャーレのふたをあけた状態で9cmシャーレの中に入れ籠状に入れて室温で10日間静置することで緩慢予備乾燥処理を行った。L-乾燥はパーライトごと菌体をアンプルにいれ分散媒として1%グルタミン酸ナトリウムを添加して凍結乾燥機を用いて行った。結果として5株中4株について直後の生残率が80%以上であっただけでなく、これまで生残がほとんど確認されていなかったオオウズラタケの苛酷条件下（37℃1,2週間）やシイタケの苛酷条件下（37℃1週間）において100%の生残が確認された。このことから緩慢予備乾燥処理によって乾燥耐性が高まった可能性が示唆された。発表ではさらに最新のデータを交えて発表を行う予定である。

現在、抗生物質として利用されているものの多くは、抗菌スペクトルが広く、我々の健康や、環境を維持している多くの共生細菌まで殺してしまう。そこで我々は、アンチセンス核酸を用いることにより、細菌群集の中から標的とする細菌だけを特異的に殺すことを目的とした本研究を立ち上げた。アンチセンス核酸は、人工的に合成したオリゴDNAやオリゴ核酸類似体などを指し、細菌内のmRNAに特異的に結合し、その翻訳を阻害する。この性質を利用して、標的細菌の生育に必須な遺伝子のmRNAのリボソーム結合領域（Shine-Dalgarno配列）周辺を標的としたアンチセンス核酸を設計することにより、目的の細菌だけを殺すことが可能になる。そこで、我々は、環境から採取したサンプルに大腸菌を混ぜて、モデル系としての実験を行った。将来的にはバイオフィルムや皮膚細菌叢などの複雑な集団に存在する1種類の細菌を配列特異的に殺菌することを目指している。

服部 黎子, 服部 勉
アチックラボ

筆者らが水田、畑および草地などから分離した各種DNB細菌（NB：nutrient broth上で増殖せず、その100倍希釈培地上で増殖できる細菌、低栄養細菌ともいう）の共通の特徴のひとつに、食塩に対する強い感受性があげられる。増殖培地中の食塩濃度が0.5%、或いは、細菌によってはそれ以下であっても、増殖は停止、または著しく抑制され、細胞は、さまざまな異形を示すようになる。近年、細菌増殖の分子的機構の研究が著しく進歩しつつあり、細胞分裂の統一的分子機構システムが構想されるようになった。この機会に、こうした展望構想に寄り添いながら、いろいろなDNB細菌が食塩存在下で示した異形細胞の超薄切片の透過型電子顕微鏡像の再吟味を行う。各DNB細菌の異形細胞は一見複雑な様相を示し、これまで、その中に何らかの規則性を見出すことが困難であった。しかし現在注目されている統一システム構想からみると、これらの異形内容は、divisomeとよばれるオルガネラ機能の異常発現や、別のオルガネラであるcarbonosomeの活発な活動などの諸結果だと推定することが可能に思われる。しかも、これらオルガネラの異常行動は、食塩など環境からもたらされるストレスを感知するrafts（細菌では、その存在は検討段階で、未確定）とよばれる細胞膜中のドメインからのシグナルによって誘起されると推定される。以上のように推論すると、DNB細菌の塩感受性という特性は、存在が想定されるraftsの、塩に対する異常に高い敏感さによるとも思われる。又その高い敏感さは、DNB細菌のrafts成分（リピドやホパノイドなど）の特性によるのではないかと想像される。今後の研究に期待したい。

井口 博之, 金ヶ崎 三千翔, 杉本 英史, 田口 和真
京都学園大・バイオ環境

【背景】植物葉には多数の多様な細菌が生息して、植物の生長や健康に影響を与えていることが分かってきている。葉面は、土壌と比べてストレスの多い過酷な環境とされる。その原因のひとつである、葉に直接降り注ぐ太陽光は、高温・乾燥・光障害（DNA損傷や活性酸素）をもたらす。一方で、微生物には、光をシグナルとして感知する能力や、エネルギーとして利用する能力があることが知られる。しかし、葉面細菌が光に対してどのように応答しているかはほとんど分かっていない。そこで本研究では、環境中より光応答能力を持つ葉面細菌をスクリーニングし、その能力を解析した。【結果】様々な植物の葉を採取し、そこから回収した菌をR2A寒天培地に塗布して30℃で培養を行い、葉面細菌を約400株分離した。分離菌をそれぞれ寒天培地に塗布し、明所（白色蛍光灯の下）と暗所とで比較して培養した。その結果、明所で黄色の色素を生産するST22株を見出し、16S rRNA遺伝子配列より *Telluria* 属に属すると推定された。吸光波長より本色素はカロテノイドと考えられ、液体培養では暗所に比べて明所で1.5倍多く色素を生産した。しかし、液体培養では固体培養に比べて色素生産量が少なかった。また、本菌は明所で紫外線耐性が向上することも分かった。以上の結果より、*Telluria* sp. ST22株は、光に応答してストレスへの防御を高めていることが示唆された。

馬場（森） 裕美^{1, 2}, 多田 千佳¹, 福田 康弘¹, 三宅 克英², 馬場 保徳², 中井 裕¹
¹東北大・院農, ²石川県大・資源研

【背景・目的】

従来、アンモニア酸化を担う微生物は、アンモニア酸化細菌（AOB）と考えられてきた。しかし、近年、メタゲノム研究やアンモニア酸化古細菌（AOA）の発見により、環境中のアンモニア酸化には、AOBだけでなくAOAも重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。しかし、AOAの分離株の報告は数例のみであり、その生理学的特性に関する知見は圧倒的に不足している。これまでの報告から、AOAのアンモニアへの親和性は、AOBと比較して高く、AOAは低濃度アンモニア環境に適応していると考えられている。一方、本研究グループは、高濃度アンモニア環境である牛ふん堆肥に、AOAが存在することを発見し、世界で初めて牛ふん堆肥由来の単一AOAの集積に成功した。そこで、本研究では、本AOAの純化を試み、その生理学的特性を明らかにした。

【方法】

AOA集積培養系にストレプトマイシンを添加し（AOAの増殖に影響を及ぼさないことを確認済み）、細菌の増殖を抑制させて、AOAの純化を試みた。16S rDNAを標的としたreal-time PCRで確認したところ、培養期間中、細菌は検出限界（ 4.3×10^4 copies/mL）以下であったことから、本培養系を用いて、AOAの生理学的特性を調査した。

【結果・考察】

35, 45, 55, 65°Cの各温度条件でAOAを培養し、アンモニア酸化遺伝子（*amoA*）の現存量をreal-time PCRで経時的に測定した。65°Cを除くすべての温度条件化でAOAの増殖が確認され、55°Cで倍加時間0.68日と最も短い時間を示した。次に、塩化アンモニウム濃度1, 10, 50, 100 mMの各条件でAOAを培養し、アンモニア濃度耐性を調査した。その結果、塩化アンモニウム濃度が100 mMでもAOAの有意な増殖が確認され、すべての実験区でAOAの倍加時間が、0.4~0.6日を示した。最後に、亜硝酸ナトリウム濃度0, 5, 10, 50, 100 mM条件下でAOAを培養し、亜硝酸耐性を調査した。亜硝酸ナトリウム濃度が上昇するにつれてAOAの増殖速度が遅くなり、50 mM以上になるとAOAの増殖は確認されなかった。従来、AOAは数mMのアンモニウムイオン濃度で増殖阻害を受けると報告されている。このことから、本AOAは、極めて高いアンモニア耐性を有する新規のAOAであると考えられる。

加藤 創一郎^{1,2}, 高篠 素子¹, 五十嵐 健輔¹¹産総研・生物プロセス, ²北大・農学院

レアースはスカンジウム ($_{21}\text{Sc}$)、イットリウム ($_{39}\text{Y}$)、およびランタン ($_{57}\text{La}$) からルテチウム ($_{71}\text{Lu}$) までの計17元素の総称である。レアースというその名に反し、地殻中の存在量としては生物の必須元素である銅や亜鉛と大差なく言うほどレアではないが、その生物利用性は長らく不明であった。しかし近年、メタン酸化細菌やメタノール酸化細菌の中心代謝酵素、メタノール脱水素酵素 (methanol dehydrogenase, MDH) に、カルシウム (Ca) を活性中心とする既知のMxaF型に加え、レアース元素を活性中心とするXoxF型が存在することが明らかとなった。メタノール酸化細菌ではMxaF型MDHを持たずレアース要求性を示すものが複数確認されている。メタン酸化細菌では高温・酸性の火山性泥池から分離されたVerrucomicrobia門の新規微生物でのみレアース要求性が報告されているが、その一般性は不明である。またこれまで微生物の培養にレアース添加培地が使用された例はほとんど無く、レアース要求性の微生物は手つかずの微生物資源として取り残されていると予想される。そこで本研究では、一般的な中温・中性環境からレアース利用性メタン酸化細菌の集積・分離培養を試みた。北海道大学構内の池底泥を微生物源とし、レアース元素 (Sc、Y、La、セリウム (Ce)、ネオジム (Nd)、ジスプロシウム (Dy)、いずれかを20 μM) を添加したCaフリー無機培地を使用し、メタンを唯一のエネルギー源として集積培養をおこなった。Caを添加したコントロールも含め、すべての培養系でメタンの消費と微生物の増殖が確認された。5回以上の継代培養ののち微生物群集構造解析をおこなった結果、計4タイプのメタン酸化細菌が検出された。そのうちタイプ3はLa添加系、タイプ4はCe添加系でのみ優占しており、そのレアース利用性・要求性が示唆された。各集積系から分離培養を試み、各タイプに近縁なメタン酸化細菌の分離株を得ることに成功した。分離株の生育特性を検証した結果、タイプ4に近縁な分離株はCe等のレアースを添加した培地では良好に生育するものの、Caを添加したレアースフリー培地では生育が大幅に低下した。以上の結果により、中温・中性の一般的な環境にもレアース利用性・要求性を持つメタン酸化細菌が存在することが初めて明らかにされた。現在、レアース要求株と近縁種の比較ゲノム解析など、さらに詳細な解析が進行中である。

坂野 優稀¹, 砂入 道夫¹, 松藤 寛², 岩淵 範之¹¹日大・生資科・応生科, ²日大・生資科・食生科

【目的】われわれは、リグニンおよび低分子リグニンを微生物を用いたバイオプロセスにより高付加価値物質へ変換する取り組みを行っており、これまでに、低分子リグニンの一種、シリングアルデヒド(SYAL)を変換、重合し有機蛍光物質を生産する菌株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1株を海水より単離している。ITH-SA-1株により生産される蛍光物質は、数平均分子量が7.2 kDaでEx=365、Em=498 nmの蛍光スペクトル示す物質であり、NMR、FT-IR分析等からその分子内にベンゼン構造を有さないことが示されている。一般に有機蛍光物質は剛直な平面構造と π 電子共役系の供給源として分子内にベンゼン環を有しているが、上記結果は、本蛍光物質が希少な特徴を有していることを示唆している(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng.2015)。

本発見以来、われわれは本蛍光物質(以下NPASFA)の構造の検討を試みており、その過程で、SYALの下流の代謝産物である3-O-メチルガリク酸(3-MGA)とトリプトンを反応させることにより、同様の性質を有する蛍光物質が生産されることを見出した(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2106)。この結果は、より単純化した系でも同様の蛍光物質が生産されることを意味しており、今後の構造決定の支援になると考え、本研究では、非バイオプロセスによるNPASFAの各種生産条件を検討した。

【結果と考察】トリプトンの主要成分は、カザミノ酸、カゼインダイジェスト、ラクトアルブミン水解物であることから、これらを個別に3-MGAと反応させ、その蛍光スペクトル、蛍光強度を検討した。その結果、カゼインダイジェスト由来の蛍光物質が、トリプトン由来の蛍光物質に最も近い蛍光スペクトル、蛍光強度を示した。次に、カゼインダイジェストは核酸やペプチド、アミノ酸等と無機物の混合物であることから、この中でまず初めにアミノ酸に注目し、上記と同様の検討を行った。これまでに合わせて15種類のアミノ酸と3-MGAとの反応を検討した結果、リジンとアルギニンで蛍光物質の生産が確認された。現在、反応至適条件を検討し、その構造解析を行っている。

岩井 伯隆, 佐々野 晴香, 矢野 憲一, 和地 正明
東工大 生命理工学院

【背景・目的】フッ素化合物は耐熱性、耐酸性などの高い安定性や撥水性などの特性を持つため、医薬品や農薬、高分子化合物など様々な分野で用いられている。しかしながら、生物機能（酵素）を用いた合成技術や分解・回収技術は少ない。そこで、生物機能を利用した新しいフッ素化学技術の構築を目指し、微生物スクリーニングにより、ベンゾトリフルオリド（BTF）を分解・脱フッ素化できる *Rhodococcus* 属細菌065240株を発見した。BTFの分解・脱フッ素化には *btf* 遺伝子群によるジオキシゲナーゼ経路が関与していることが遺伝学的解析から示唆された。しかし、各 *btf* 遺伝子の破壊株では予想される中間代謝物が検出されなかった。そこでBTF代謝能を持たない *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032に *btf* 遺伝子を導入することにより、BTF代謝経路の解明を試みた。【方法・結果】IPTGによって発現が誘導できる *btfA*, *btfAB*, *btfABC* をそれぞれプラスミドにより *C. glutamicum* ATCC 13032に導入した組換え株を作成した。1%植菌した培養液に基質BTFとIPTGを同時添加し、30°Cで培養した後、上清のフッ化物イオン濃度をイオン電極により測定した。その結果、いずれの組換え株からもフッ化物イオンが検出され、*btfAB* を導入した株において特に高いフッ化物イオンが検出された。この結果より、導入した *btf* 遺伝子が *C. glutamicum* 内で機能し、脱フッ素化には *btfA* と *btfB* が重要であることが示唆された。そこで、それぞれの酵素反応が推測通り進んでいるかを確認した。各培養液の上清を解析した結果、*btfA* のみを発現させた株の上清からはジオキシゲナーゼ反応産物であるジエン化合物が、*btfAB* を発現させた株の上清からはデヒドロゲナーゼ反応産物である3-trifluoromethylcatecholが確認できた。従って、BTFは *C. glutamicum* 内でBtfABタンパク質によって確かに代謝されている事が示された。推測通りに反応が進んでいるうえで、かつ脱フッ素化されていることから、3-trifluoromethylcatecholの安定性について調べた。その結果、3-trifluoromethylcatecholは塩基性条件下で非酵素的に脱フッ素化され、2,3-dihydroxybenzoateが生成されることが分かった。以上の結果から、*btf* 遺伝子を利用したフッ素化合物の分解方法と、新しいフッ素化合物への変換方法について提案したい。

長山 純子, 藤川 大智, 齋藤 貴
神奈川工大・工

Fuscoporia obliqua は、他の担子菌類と比べ突出した高い抗酸化力を持ち、消化器系のがんに対する有用性が明らかにされている。その他にも糖尿病、高血圧、動脈硬化などの予防効果に期待が持たれている。また抗ウイルス力が強く、インフルエンザやHIVウイルスにも効果があると報告されているキノコである。しかし、*Fuscoporia obliqua* は自然環境における発生率が非常に低く、大量供給が困難という問題を抱えている。

そこで、*Fuscoporia obliqua* 菌糸体の培養を目的とした最適な培養条件の確立を行った。その結果、炭素源としては、D (+)-グルコース、D (+)-マンノース、D (+)-ガラクトースの添加により菌糸体の成長が速く、D (+)-フルクトース、D (+)-キシロースの添加時は逆に成長が遅延することが分かった。窒素源として硝酸カリウムを添加時に最も速く、一方、塩化アンモニウムや硫酸アンモニウムの添加時は菌糸の生育が認められなかった。D (+)-マンノースとカゼインペプトンを添加した培地では、pH6の培地において菌糸体生育が最も速いことが分かった。一方、D (+)-マンノースと硝酸カリウムを添加した培地では、pH9の培地における菌糸体の生育速度が最も高いことも分かった。しかしいずれの培地においてもpH調整物質を加えない場合の方が生育速度が高い傾向を示した。ビタミンB類は培地に対して0.1 vol%の濃度になるように添加すると最も菌糸体の成長が速いことが分かった。培養温度に関しては、30℃が最適であり、低温では菌糸の生育が認められなかった。以上のことから *Fuscoporia obliqua* 菌糸体の培養条件として、D (+)-マンノース、カゼインペプトンおよび硝酸カリウム、0.1 vol%ビタミンB類、培養温度30℃の条件が菌糸体の生育に適切であることが明らかとなった。

宮野 怜¹, 松尾 洋孝², 野中 健一², 稲橋 佑起², 庭野 吉己³, 塩見 和朗², 高橋 洋子², 大村 智², 中島 琢自²
¹北里大院・感染制御, ²北里大・生命研, ³東北大院・歯

【背景と目的】微生物が生産する二次代謝産物は人知の及ばない構造を有し、抗生物質や農薬などに利用され、ヒトの健康や生活の質を向上させる一助となってきた。

近年の画期的な分析機器の発展により、多くの微生物二次代謝産物が検出でき、既知化合物かそうでないかを容易に判断出来るようになってきた。当研究室では微生物培養液抽出物に含まれる化合物の物理化学的性状に着目した physicochemical screening (PC screening) を積極的に進めてきた。すなわち、化合物の UV スペクトルや分子量等の物理化学的性状情報をデータベースと比較し、新規性を予測して化合物を精製する方法である。これまで、当研究室では放線菌から PC screening により新規骨格を有する mangromycin 類¹⁾ や分子内にイミニウムイオンやピリジニウムイオンを有する iminimycin 類^{2, 3)} 等の新規化合物を取得してきた。

本研究は、北里生命科学研究所が保有する糸状菌株から、PC screening によって新規化合物を見出すことを目的とした。

【方法と結果】*Pochonia* sp. FKI-7537 株をきな粉を主成分とした生産培地で培養し、得られた培養液抽出物を LC/UV-MS で測定した。この LC/UV-MS データを解析し、データベース検索を行った結果、2 つの化合物 (FKI-7537A, B と仮称) が新規化合物と推定された。

これらを取得するため、FKI-7537 株を生産培地 6 L で 2 日間振盪培養後、培養液を液々分配および各種クロマトグラフィーに供し、FKI-7537A を 10 mg, FKI-7537B を 46 mg 取得した。構造解析を行った結果、FKI-7537A, B はクロモン骨格とムコノラクトンを有する新規化合物であった。これらを菌株に因んで pochoniolide A, B と命名した。

比旋光度、CD スペクトルを測定した結果、これらの化合物がラセミ体で存在していることが示唆された。キラルカラムを用いて分析した結果、どちらも 2 つのエナンチオマーがほぼ 1:1 の比率で存在していた。Pochoniolide B の各エナンチオマーを分取し、比旋光度と CD スペクトルを測定した結果、比旋光度も CD スペクトルも正負逆の結果が得られた。

Pochoniolide A, B はスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2) に対して消去活性を示した。

【参考文献】 1) *J. Antibiot.*, 67, 253-260 (2014), 2) *J. Antibiot.*, 69, 611-615 (2016), 3) *Tetrahedron Lett.*, 57, 3284-3286 (2016)

正木 啓仁², 小坂 優介³, 松下 保彦⁴, 片山 葉子¹¹農工大・院農学・物質循環環境科学専攻, ²農工大・院農学・物質循環環境科学専攻・(現,NITE), ³農工大・農学・環境資源科学
科, ⁴農工大・学術研究支援総合センター

【背景】

硫黄は生物の必須元素のひとつであり、例えばジスルフィド結合の形成は生物機能の発現に大きく寄与している。海洋や土壌では主に硫酸塩の形で存在し、微生物や植物に利用される。一方、大気中に安定に存在する硫黄化合物は硫化カルボニル(COS)であり、対流圏には全球規模で約500 pptv の濃度で硫黄化合物の中では最大である。しかし、COSを生物の硫黄源やエネルギー源とみなした報告はほとんどない。我々の研究室ではCOSを分解する微生物として、*Mycobacterium*属の細菌や*Trichoderma* 属の真菌に高いCOS分解活性を見出した。化学合成細菌がCOSを電子供与体としてエネルギーを獲得する酵素系は解明されているが、従属栄養性の微生物についてはほとんど報告がない。そこで本研究では高いCOS分解活性を示した*Trichoderma harzianum* THIF08株を用いてCOS分解酵素の精製とその遺伝子のクローニングを試みるとともに、COSを本菌株が取り込むことによる生理学的性状への影響を見ることにより、COSを介する新規硫黄同化経路の可能性を検討した。

【手法】

培養した菌体を破碎して調製した粗抽出液をクロマトグラフィーによりCOS分解酵素を精製、そのN末端アミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列に相同性を示した遺伝子を大腸菌で発現させ、COS分解活性の有無を確認した。THIF08株の胞子を回収し、硫黄成分を含まない組成に改変した寒天平板培地に植菌した。接種後の培地をバッグ内に静置、密閉後、バッグ内のCOS濃度を大気濃度～2000 ppmvとなるようにCOSを添加した。培養後、バッグ内からシャーレを取り出し、菌体の生育を比較した。

【結果と考察】

THIF08株は、大気濃度～12500 ppmvの濃度のCOSを馴化なしで速やかに分解できる。THIF08株から精製したCOS分解酵素は約20 kDaのサブユニットから構成され、そのN末端アミノ酸配列として10 残基が決定された。配列を相同性検索したところ、炭酸脱水酵素に高い相同性を示した。また、この遺伝子を大腸菌で発現させたところ、COS分解の活性が確認された。硫黄源を全く含まない条件で培養されたTHIF08に比べ、気相にCOSを添加した系では菌体の成長が上回り、孢子形成並びに色素の生産も確認され、気相にCOSが存在することは本菌株の生育に大きく影響することが明らかとなった。以上の結果より、THIF08株には炭酸脱水酵素類似の酵素を用いて、COSを硫黄源とする新規硫黄同化経路の存在が示唆された。

Mina Ootsuka¹, Yoko Yoshioka-Ikunaga¹, Tomoyasu Nishizawa², Morifumi Hasegawa², Yasurou Kurusu², Hiroyuki Ohta²

¹United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²Ibaraki University College of Agriculture

Environmentally persistent alkylphenols such as 4-nonylphenol (NP) and 4-octylphenol (OP) are known to be estrogenic in animals. *Sphingobium cloacae* JCM 10874^T and *Sphingobium amiense* YT^T can degrade branched NP and OP. Although JCM 10874^T is versatile for all isomers of branched NP, YT^T degrades a narrow range of NP isomers. In this study, genomic DNAs of YT^T and JCM 10874^T were sequenced using MiSeq and PacBio RS II, respectively, to identify their genes responsible for NP and OP degradation. The genome sequences were annotated using the Microbial Genome Annotation Pipeline and NCBI-nr BLASTP program. Genes of octylphenol 4-monooxygenase (*opdA*) and nonylphenol monooxygenase (*nmoA*), both involved in alkylphenol oxygenation, were found in JCM 10874^T, while only *opdA* was found in YT^T. Percentage of amino acid sequence identity between OpdAs of both the strains was 99.8. Previously, one of the oxygenation products was identified as hydroquinone (HQ) by GC-MS analysis. In support of this, our results showed the presence of *hqd* gene cluster responsible for HQ degradation in the strains. Comparing the deduced amino acid sequences of HQ catabolic pathway enzymes, the identity is as high as 99.4% for HqdA and 100% for HqdR, HqdB, HqdC, HqdD, HqdE, and HqdF. Further studies are in progress to know the key genetic structure determining the specificity for oxygenation of NP/OP isomers.

舟橋 達也¹, 井戸 友梨¹, 田邊 知孝¹, 宮本 勝城², 辻坊 裕², 山本 重雄¹¹松山大・薬・衛生化学, ²大阪薬大・微生物学

【目的】 *Aeromonas hydrophila*は下痢や創傷感染の起因菌として知られている。多くの細菌は生息環境中の鉄欠乏ストレスに応答してシデロフォア（鉄輸送キレート分子）を産生し、 Fe^{3+} -シデロフォアに対する外膜受容体を介して環境中から効率的に鉄を獲得する。また、菌自身が産生するシデロフォア以外に他菌種の産生する外因性シデロフォアを介して鉄を獲得する機構も存在している。本菌はシデロフォアとしてAmonabactin (Amo) T789、T732、P750、P693を産生する。しかし、これらAmoを含むシデロフォアを介した鉄の外膜及び内膜輸送に関与する遺伝子について不明であった。そこで、本研究ではAmo及び外因性シデロフォアの外膜及び内膜輸送に関与する遺伝子を同定し、解析を行った。【方法】 *A. hydrophila* ATCC7966を鉄制限Tris合成培地にて培養後、培養上清は既報に従い、HPLCにより4種類のAmoを分離、精製した。鉄制限条件下での増殖試験は鉄キレーターとして0.25mM EDDAもしくは0.2mM ビピリジルを添加したLB培地にて行った。各遺伝子欠失株の作成は2回交差の相同性組換えにより行った。各遺伝子の転写制御についてはRT-qPCR又は β -ガラクトシダーゼ活性測定により解析した。【結果及び考察】 *entA*欠失株（Amo非産生）について鉄制限条件下、分離精製した4種のAmoをそれぞれ添加したところ増殖の回復が認められた。また、外因性シデロフォアとしてdesferrioxamine B、enterobactin、ferrichromeの利用能を明らかにした。Amoに対する外膜受容体遺伝子として*autA*を同定した。また、*autA*だけでなく、外因性siderophore、enterobactinに対する受容体遺伝子*irgA*もAmo利用に関与していることが明らかとなった。*AutA*と*IrgA*を介したシデロフォアの輸送は共通した内膜輸送系を介して行われていた。*autA*と*irgA*、さらに共通の内膜輸送系遺伝子の転写はリプレッサーであるFurを介した鉄制御を受けることを示した。本菌において自身が産生するシデロフォア以外の多様な鉄獲得機構の存在が明らかとなった。

根岸 剛志¹, 西澤 智康², 三浦 隆匡³, 長南 茂²¹茨城大・院農, ²茨城大・農, ³NITE・NBRC

【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、アミノ酸配列を基に真正細菌では原核I型、II型、およびIII型に分類される。有用物質生産への応用を目指して、これまでに *Pseudomonas putida* 由来原核III型CoaA遺伝子 (*Pp-coaA*) を保持するプラスミドを用いて、*Escherichia coli* の細胞内CoAプールサイズをおよそ5倍にすることに成功している。今回は *Pp-coaA* をゲノムDNAに導入した *E. coli* JB9-*coaA* 株を作製し、細胞内CoAプールを解析した結果を報告する。

【方法】*Pp-coaA* を actinophage R4 由来 *attP* サイトを2つ持つ pEQCM9 の T5 プロモーターの下流に連結し、*SphI* で *attP-Pp-coaA-attP-cat* 断片を回収して環状化後、JM109 のゲノムDNA上に *Streptomyces parvulus* 由来 *attB*、および *attB* と *attP* 間で部位特異的組換えを触媒する R4 インテグラーゼ発現プラスミド (pSre4) を保持する JB9(4) 株に形質転換し、*Pp-coaA* がゲノムDNAに導入された JB9-*coaA* 株を取得した。組換え菌は2%グルコースおよび5mM パントテン酸を含む M9Y 培地を用いて0.1 mM IPTG の存在下で30°Cで24時間培養した。細胞内CoAプールはアシル-CoAサイクリング法で解析した。【結果と考察】*Pp-coaA* のゲノムDNAへの導入はPCRで確認され、JB9-*coaA* 株はJM109株およびJB9株と同様の生育を示した。JB9-*coaA* 株のCoaA活性はIPTG存在下で120倍、非存在下でも13倍に上昇し、この結果、細胞内CoAプールサイズは21倍および6倍それぞれ大きくなった。JB9-*coaA* 株のIPTG存在下で観察されたCoAレベル (11 nmol/mg dry cell wt) は *Pp-coaA* 発現プラスミドの形質転換体での3 nmol/mgより3.6倍高く、IPTG非存在下ですら3 nmol/mgと同等の細胞内濃度を示した。このようにゲノムDNAへのCoaA遺伝子の導入は培養液への抗生物質の添加も必要なく、生育も良いので有用物質生産により適していると考えられる。

山本 尚輝¹, 一色 理乃¹, 河合 祐人¹, 松本 慎也², 常田 聡¹¹早大・院先進理工, ²名大・医細菌学

同一遺伝子を持つクローナルな細菌集団であっても、1細胞レベルで見ると様々な表現型を持つことが明らかになってきた。このような不均一な表現型は様々なストレスに対する生存戦略の1つとして近年注目されている。persisterも細菌の不均一性によって生じる多様な表現型の1つであることが知られており、自身の増殖を抑制させることによって、増殖を標的とする様々な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、これまでに非分裂細菌を検出する大腸菌マーカー株を独自に開発し、これを用いて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。また、抗生物質抵抗性試験およびシングルセル観察の結果から、確率的な*ldhA*発現によってpersister形成が誘導されることが示唆された。*ldhA*が担う乳酸発酵はNADHやピルビン酸を基質として働くため、中心代謝経路において重要な役割を持つと考えられる。仮に、乳酸発酵が中心代謝経路に影響を及ぼすことがpersister形成に重要であるとすれば、非常に興味深い。そこで、本研究では*ldhA*発現によってpersisterが形成されるメカニズムを調べるために、細菌の中心代謝経路に着目した。特にpersisterではエネルギー産生において重要なプロトン駆動力が減少するという報告があるため、染色キットによって膜電位を評価することで*ldhA*過剰発現株及びノックダウン株のプロトン駆動力を測定した。その結果、*ldhA*過剰発現によりプロトン駆動力は著しく増加し、ノックダウンで減少した。*ldhA*過剰発現により、プロトン駆動力が増加したにも関わらずpersisterが増加したことに关しては、既往の仮説とは異なる結果であるといえる。そこで、プロトン駆動力阻害剤であるCCCPを*ldhA*過剰発現株およびノックダウン株に投与したところ、過剰発現ではpersister形成に変化は見られなかった一方、ノックダウンではpersisterの減少が抑制された。この結果から、プロトン駆動力が*ldhA*発現によるpersister形成に影響することが示唆されたが、プロトン駆動力だけで*ldhA*発現によるpersister形成メカニズムを説明するには不十分であると考えられる。今後は*ldhA*発現による中心代謝経路の代謝活性の変化に焦点を当てることによって、*ldhA*発現によるpersister形成メカニズムの全体像が明らかになると期待される。

中島 悠, 吉澤 晋, 木暮 一啓

東京大学 大気海洋研究所 生物遺伝子変動分野

ロドプシンはレチナールが結合した7回膜貫通型の光受容タンパク質で、淡水・海水・高塩環境などに生息する様々な原核生物に分布する。ロドプシンは、レチナールが光を受けて異性化し、その構造に変化を与えることによってイオンポンプあるいはセンサーとして機能する。レチナールは β -カロテンからBeta-carotene 15,15'-dioxygenase (*blh*)という酵素を介して生産されるが、近年、ゲノム上にロドプシン遺伝子を持つが*blh*遺伝子を持たない株が数多く見つかった。では、レチナール生産経路を持たない株のロドプシンは本来の機能を発揮しうるのだろうか？ 発揮するならどのようにそれを行うのだろうか？ この疑問に答えるため、ロドプシン遺伝子を持つが*blh*遺伝子を持たないUltra-small actinobacteria: *Aurantimicrobium minutum* KNC^Tを用い、様々な条件下におけるロドプシンのイオンポンプ活性を調べた。 *A. minutum*を明条件および暗条件で培養を行い、対数増殖期後期、定常期で細胞を回収、その細胞を用いてロドプシンのイオンポンプ活性の測定を行った。その結果、明条件・暗条件共に、培養細胞からイオンポンプ活性が確認できた。これは、*blh*遺伝子を持たない環境分離株からロドプシンのイオンポンプ活性の初の観察例である。また、レチナールをそれらの細胞に添加すると明条件では添加前の約4倍～20倍、暗条件ではほぼ同等～約2倍の活性の上昇が見られた。この結果から以下の3つのことが示唆される。1. *blh*遺伝子を持たない細菌の細胞内にレチナールが存在する2. そのレチナール量は細胞内に存在するロドプシントタンパク質量よりも少ない（1つのロドプシンに1分子のレチナールが結合するため）3. これまでに知られていないレチナール生産経路が存在する、あるいは他の細菌が生産したレチナールを取り込んで利用する 純粋分離株を用いた観察であるため、使用株には未知のレチナール合成経路が存在する可能性がある。ただし、レチナールの添加効果が明瞭なことから、天然環境中では他の菌が生産するレチナールを“盗んで利用する”可能性もある。今後、さらに生理、生化学的検討を加え、*blh*遺伝子を持たない株の光利用メカニズムの解明を行っていく予定である。

宮本 龍樹^{1, 2}, 横田 亜紀子², 大田 悠里^{1, 2}, 常田 聡¹, 野田 尚宏^{1, 2}¹早大・院先進理工, ²産総研・バイオメディカル

【研究背景】Toxin-Antitoxin機構は原核生物に広く保存されている増殖抑制機構であり、毒性タンパクであるToxinと抗毒性タンパクであるAntitoxinから構成される。通常、AntitoxinがToxinと複合体を形成することでToxin分子の毒性が抑制されているが、微生物がある種の環境ストレスに曝された際、Antitoxinの分解が起き、Toxinが細胞内で遊離、微生物の増殖が抑制される。RNA干渉酵素はRNAを配列特異的に切断するToxin分子の総称である。大腸菌では環境ストレスに曝される時間が長引いた際、RNA干渉酵素を介した細胞死が誘起されることが報告されているが、単細胞生物である原核生物にとって一細胞の死は直接的に個体の死を意味するため、原核生物が進化の過程でRNA干渉酵素を獲得してきたのには何か理由があるはずである。以上を踏まえ、本研究では「なぜRNA干渉酵素が微生物に必要なのか？」の解明を目指す。【実験方法、実験結果】遅増殖性の独立栄養性細菌は多くのRNA干渉酵素を持つと予見されている。そこで本研究では代表的な硝化細菌*Nitrosomonas europaea*が持つRNA干渉酵素を研究対象とした。大腸菌を宿主とし、*N. europaea*が持つRNA干渉酵素 MazFneの発現・精製を行った。取得したMazFneを基質RNAと反応させたところ、RNAの切断活性が確認された。そこで同様の手法を用いて、対となるAntitoxinタンパク(MazEne)を取得を行なった。*In vitro*のアッセイ系においてMazEneがMazFneのRNA切断活性を抑制したことから、これら遺伝子群がToxin-antitoxin対として機能することが判明した。次にMazFneの分子学的機能を明らかにすべく、超並列シーケンシング法・蛍光消光現象を組み合わせ、その認識切断配列の同定を試みた。この結果、MazFneが特定の三塩基を特異的に認識・切断することを証明することに成功した。以上から、*N. europaea*がMazFneを転写後修飾因子として使用し、細胞内RNAの選択的分解を行うことで、翻訳プロファイルを制御している可能性が示された。

一色 理乃¹, 藤谷 拓嗣^{1, 2}, 田中 大器², 関口 哲志², 常田 聡^{1, 2}¹早大 院先進理工, ²早大 ナノ・ライフ創新研究機構

【背景・目的】アンモニウムを硝酸へ変換する硝化反応は、窒素循環過程に不可欠な反応である。この硝化反応を担う硝化菌の増殖や生化学的反応をコントロールすることができれば、排水処理をはじめとする環境技術や農業に貢献できる。しかし、硝化菌純菌株を同じ環境で培養しても、その時々で増殖活性が異なり、一度純菌株を獲得しても安定して継代することが難しい。純菌株でも増殖活性にばらつきがみられるため、培養が困難な原因は構成する個々の細胞の増殖速度にばらつき（＝不均一性）が大きいことであると考えた。そこで、硝化菌の増殖不均一性を理解し、不均一性を制御する因子を見出すことで、安定した培養・継代方法を創出することを研究目的とした。

【方法】アンモニア酸化細菌*Nitrosomonas mobilis*をシングルセルレベルでタイムラプス観察することで、個々の細胞ごとの増殖能を判別した。観察サンプルとして、対数増殖期および定常期の細菌培養液を用意した。観察には、マイクロ流体デバイスを使用した。マイクロ流体デバイスを用いることで、微小流路内に細胞を固定し培地を流すことで、長時間生きたまま、個々の細胞ごとの増殖挙動を追跡することができる。

【結果・考察】*N.mobilis*には、単一細胞で存在するシングルセル状態と単一菌種が凝集するマイクロコロニー状態が存在することを見出した。対数増殖期では、シングルセルのうち53%が増殖し、マイクロコロニーで増殖する細胞は存在しなかった。定常期の細菌集団では、マイクロコロニーのうち84%、シングルセルのうち10%で増殖が見られた。以上の結果より、*N.mobilis*では単一菌株集団でも増殖能に不均一性が見られ、環境の違いにより不均一な状態が変化することが明らかになった。対数増殖期の細胞密度が低く培地中に代謝物の蓄積がない環境では、シングルセルが増殖する。一方で、定常期に入ると、細胞密度が高く培地中に代謝物が蓄積した環境になり、増殖能を持つシングルセルの割合が少なくなる一方で、マイクロコロニーが増殖した。したがって、*N.mobilis*は細胞密度もしくは代謝物の影響により増殖様式を変えることが明らかになった。以上のような、環境変化に伴う増殖不均一性の変化を考慮することで、より増殖する細胞の割合が多くなるような効率的な培養手法を提案することができる。

武田 尚¹, 若菜 大悟¹, 宮内 啓介², 細江 智夫¹¹星葉大, ²東北学院大

ベルベリン (berberine) は、キハダやオウレンなどの植物に含まれ、鮮やかな黄色を呈するベンジルイソキノリンアルカロイドの一種であり、抗菌作用を持つ生薬として使用されてきた。しかし、近年はベルベリンの抗酸化作用に由来するコレステロール低下作用・神経変性改善作用などが注目されている。我々はベルベリンを出発物質とした微生物変換による有用化合物の創出・生産を目的として、ベルベリン分解能を持つグラム陰性菌 *Sphingobium* sp. BD3100株が単離し、その分解物や分解に関与する酵素遺伝子群の解明を行ってきた。これまでに、BD3100株におけるベルベリンを demethyleneberberine に変換する2つの酵素遺伝子 *brdA1* と *brdA2* が特定された。本研究では、BD3100株のベルベリン分解に関与する酵素の発現がベルベリンによって誘導されることを明らかにした。ベルベリンを含む培地および含まない培地で培養したBD3100株の菌体をリン酸緩衝液で洗浄し、休止菌体を作製した。リン酸緩衝液中で $OD_{600} = 5$ の休止菌体と 0.5 mM ベルベリンを反応させて、ベルベリンの分解と中間代謝物の蓄積を HPLC で検出した。ベルベリンで誘導したBD3100株の休止菌体では、非誘導の休止菌体よりも速いベルベリンの分解が見られた。この結果は、BD3100株のベルベリン分解に関与する酵素がベルベリンによって誘導されることを示唆した。BD3100株においてベルベリンの脱メチレン化に関与する *BrdA1*, *BrdA2* の誘導を調べるため、それぞれの遺伝子破壊株の作製を行い、誘導・非誘導休止菌体によるベルベリンの分解を HPLC で調べた。*brdA2* 破壊株は非誘導時と比較して誘導時において速やかなベルベリンの減少がみられた。一方、*brdA1* 破壊株では誘導・非誘導におけるベルベリン分解の差は見られなかった。これらの結果はBD3100株においてベルベリン脱メチレン化酵素 *BrdA1* が誘導されていることが示唆された。今後は、*BrdA1* の誘導メカニズムを明らかにするために、ベルベリン誘導プロモーターおよび誘導に関与する転写制御因子の特定を行う予定である。

松尾 洋孝^{1,2}, 野中 健一^{1,2}, 長野 由梨子³, 藤倉 克則³, 高橋 洋子¹, 大村 智¹, 中島 琢自^{1,2}
¹北里大・生命研, ²北里大・院感染制御, ³海洋開発研究機構

糸状菌は医薬品、農薬、生化学試薬といった様々な有用物質の探索源として広く用いられている。一般的に、これまでに見出されてきた生物活性物質の多くは、ある特定の活性を指標に探索されてきたため、目的の活性と偶然に一致した化合物が存在していた場合のみ化合物が取得され、たとえ新規物質が存在していたとしても見逃されてきた可能性がある。当研究室ではこれまでに、化合物の物理化学的性状を指標とした“Physicochemical (PC) screening”によりユニークな骨格を有する新規化合物を取得しており、後にその有用性を見出してきた (Nakashima T. *Biochem. Pharmacol.*, 134, 42-55, 2017)。これまでは物質探索源として陸上由来の糸状菌が主に用いられてきたが、海洋研究の発展にともない深海由来の糸状菌を取得することができるようになった。深海由来糸状菌は陸上由来とは異なる代謝系を有することが示唆されている。本研究では、深海由来の糸状菌に着目し、PC screening により新規物質を探索して取得することを目的とした。そこで、深海由来糸状菌の中から、特に分類学的に希少性が高い糸状菌培養液を選定し、LC/MS で分析した。各サンプルに含まれる化合物の物理化学的性状を解析し、天然物質データベース Dictionary of Natural Products と照合した結果、所属不明糸状菌 FKJ-0025 株が麦芽エキスを主成分とする培地 (F38) で生産する m/z 297.1697 $[M+H]^+$ に疑分子イオンピークを有し、 $\lambda_{\max} = 296$ nm にUV 極大吸収をもつ化合物を新規化合物と推定した (FKJ-0025A 物質と仮称)。FKJ-0025 株は ITS 領域に基づく DNA 解析の結果、いずれの属にも該当しなかった。化合物を取得するため、FKJ-0025 株を F38 培地 3 L で培養後、各種クロマトグラフィーにより精製し、FKJ-0025A 物質を 1.5 mg 得た。また、FKJ-0025A 物質の取得の過程で、類似した UV スペクトルを示す物質を 2 種類 (FKJ-0025B および C 物質と仮称) 確認したため、それぞれ 2.5 mg および 1.5 mg 取得した。各化合物の構造解析の結果、FKJ-0025A 物質はトポイソメラーゼ阻害剤である SF-227 であったが、FKJ-0025B および C 物質はヒドロキシキノールを基本骨格とする新規物質であった。これら物質の抗菌活性を評価した結果、FKJ-0025C 物質は *Bacillus subtilis* KB-211 に対して抗菌活性を示した。

菊池/Kikuchi 洋輔/Yousuke¹, 清川 達則², 森永 花菜², 諏佐 勇磨², 安田 まり奈², 奥脇 響³, 相馬 隆光³, 尾花 望³, 豊福 雅典³,
野村 暢彦³, 古寺 哲幸¹, 安藤 敏夫¹, 福森 義宏¹, 田岡 東¹
¹金沢大・理工, ²筑波大・院生命, ³筑波大・生命

細菌は、細胞間でコミュニケーションを行いバイオフィルムを形成するなど集団として振る舞うことが知られている。細菌から放出される膜小胞（Membrane Vesicle: MV）は、細胞間コミュニケーションのための情報伝達物質や遺伝物質の輸送を担っている。MVは、直径が十～数百 nmのリン脂質膜小胞であり、ホストの細胞表面からの出芽や、細菌集団中の一部の細胞が溶菌することにより形成され、他の細胞表面に融合することで情報伝達を行うと考えられている。しかしながら、MVを介した情報伝達の分子基盤については、ほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では生体分子を、生理的環境（緩衝液など）中でナノメートルの空間分解能で観察することができる高速AFMを用いて、個々のMVの形状と物性を調べることで、MVの特性解析を行った。私たちは、緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa*が産生したMVを液体培地中から密度勾配超遠心分離法により精製した。精製したMVを、マイカ上に吸着させ、PBS緩衝液中で高速AFM観察を行った。マイカ表面を、(3-Aminopropyl) triethoxysilaneで処理し基板表面を正に帯電させることで、MVを効率的に基板表面に固定することに成功した。基板に吸着したMVの直径は、およそ10 nm~100 nmで多様な大きさのMVが観察できた。MV表面の物性を、高速AFMの位相差モードを用いて調べた。位相差モードでは、探針と試料間の相互作用が、探針振動の位相差に影響することを利用し、試料表面の粘弾性や探針との摩擦などの分布をイメージングすることができる。その結果、個々のMVが示す位相差の値は均質ではなく、0.6 ~3.6 degの範囲で分布しており、個々のMVの物性にばらつきがあることが示された。また、MVの大きさとMV表面の柔らかさの関係には強い相関は認められず、同じ大きさのMVでも、物性が異なるものが観察された。これらの結果から、*P. aeruginosa*が産生したMVの物性に多様性があることが明らかになった。現在、培養条件の違いが、産生されるMVの物性の多様性に与える影響について検討中である。

石井 拳人, 藤谷 拓嗣, 常田 聡
早大・院生医

【目的】*Nitrotoga*は無機炭素を炭素源とし、亜硝酸をエネルギーおよび窒素源とする化学合成独立栄養細菌である。本研究室では、*Nitrotoga* sp. AM1の集積化に成功している。しかしながら、集積サンプル中に共存する従属栄養細菌と比べてAM1の増殖速度が極めて遅いため分離培養には至っていない。そこで本研究では、AM1のゲノム情報から増殖速度に大きな影響を及ぼす代謝および輸送系を推定し、AM1の増殖を促す物質を探索することで分離培養に活かすことを目的とした。

【方法】MiSeqを用いてペアエンドシーケンスを実施し、AM1のドラフトゲノムを構築した。ドラフトゲノムをMicroScope annotation platformに統合してアノテーションした。ゲノム情報の中で、特に増殖速度に影響する窒素同化経路に着目し、AM1の増殖を促進する物質を探索した。候補物質を培地に添加し、生理活性試験を行った。

【結果・考察】ゲノム解析の結果、AM1はNirBDによって亜硝酸をアンモニアへ同化的に還元し、窒素源として利用していることがわかった。一方、AM1はアンモニア透過酵素AmtBを2コピー保持しており、アンモニアを直接窒素源として利用できるのではないかと考えた。そこで亜硝酸を含む無機培地にアンモニアを0–50 mMで添加し、経日的にサンプリングした。AM1の亜硝酸酸化速度は、アンモニア1もしくは10 mM存在下で最も速くなった。アンモニア存在下において、AM1は亜硝酸同化に必要な還元力を節約できる。この還元力はプロトン駆動力の形成や炭素固定に利用されたため、AM1の増殖速度が上昇したと考えられる。またゲノム上に有機物輸送体Sugar ABC transporterがコードされており、解糖系およびTCA回路に必要なすべての遺伝子が保存されているため、有機物もAM1の増殖を促進するのではないかと推定した。実際に亜硝酸を含む無機培地にピルビン酸0.5 mMを添加すると、亜硝酸酸化速度は3倍以上上昇した。AM1はピルビン酸を細胞質内へ取り込み、異化的に代謝した可能性がある。またピルビン酸は脱炭酸することで、電子伝達の過程で発生する過酸化水素を化学的に二酸化炭素と水に分解する。つまり、ピルビン酸の添加によって亜硝酸酸化活性が上昇した理由として、TCA回路の亢進と酸化ストレスの緩和が挙げられる。アンモニアおよびピルビン酸を含む培地で培養と継代を繰り返すことで、AM1分離株を獲得できることが予想される。

寺地 裕康¹, 村上 千穂¹, 金田一 智規¹, 大橋 晶良¹, 青井 議輝²¹広島大・院工, ²広島大・院先端

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、いくつかの微生物は自身の不利な環境に晒されると、VBNCや休眠といった非増殖状態に移行し、死滅を防ぐ対処機構があることが知られている。そこで我々は多くの微生物が培養できない理由として、それらが実際に生息している環境中では増殖しない状態（非増殖状態）で生存しており、仮に人工的な培養条件（適切な培養条件と想定される条件）に移行させてもそれらは単純には増殖を開始しない、そして環境中の一定の割合の微生物は共通してそのような性質を持っているのではないかという仮説を考えた。本研究では、門レベルで難培養性を示す難培養性微生物*Nitrospira*をモデルとして用いて、非増殖状態（休眠状態）に陥る条件と覚醒する条件を明らかにし、さらに非増殖状態に陥るという性質と環境微生物の難培養性との関係性を解明することを目的とした。一旦非増殖状態に陥った*Nitrospira*を覚醒させる条件が既に明らかになっていることから、本研究ではまず*Nitrospira*が非増殖状態に陥る条件を探索する実験系を確立した。*Nitrospira*を所望の条件（非増殖状態に陥る候補条件）に一定期間晒し、その後①通常の培地条件と②そこに覚醒因子を添加した系にそれぞれ移し回復率を定量評価した。その結果、*Nitrospira*は一旦非増殖状態に陥ると、増殖に理想的な条件に移しても増殖を開始しないが、覚醒因子を添加した場合のみ再び増殖を開始する現象が確認できた。また、*Nitrospira*は増殖に必要なエネルギーの獲得が十分に行えなくなる条件に晒されると不可逆的な非増殖状態に陥ることが示唆された。

村上 千穂¹, 金田一 智規¹, 大橋 晶良¹, 町田 光史², 中尾 洋二², 青井 議輝³
¹広島大・院工, ²早稲田大・院理工, ³広島大・院先端

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。しかし、共存する従属栄養細菌が*Nitrospira*の増殖の活性化に関わっているかどうかに関してはよく分かっていない。そこで、*Nitrospira*と共存する従属栄養細菌を複数菌株単離し、*Nitrospira*との共培養を通じて亜硝酸酸化反応を促進する微生物をスクリーニングしたところ、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*自身の活性を促進または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、通常に分離培養条件(回分培養)では阻害物質が蓄積するために*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。

中村 聡美¹, 古賀 雅貴¹, 龍田 典子¹, 上野 大介¹, 片山 葉子², 染谷 孝¹
¹佐賀大・農, ²東京農工大・農

【背景と目的】

カンボジア王国のアンコール遺跡では砂岩の浅浮き彫りや支柱底部が劣化剥離するなどの風化が進行し、文化財保護上、深刻な問題となっている。これらの原因の一つに石材表面でのイオウ酸化微生物の関与が指摘されている (Liら, 2008)。その基質であるイオウ源は寺院内に蓄積しているコウモリの糞(グアノ)の可能性が考えられるが、未解明である。本研究では、グアノ中の各種イオンを定量するとともに、イオウ酸化微生物を培養・分離・同定し、微生物的劣化におけるグアノとイオウ酸化微生物の寄与の解明を目的とした。

【実験方法】

2014年及び2015年に採取したグアノ18点(化石化グアノ5点, 湿潤グアノ8点, 乾燥グアノ5点)を供試した。グアノ中のイオウ酸化微生物の培養には、粉末イオウ添加WS5液体培地及びそれに酵母エキスを加えたWS5Y液体培地によるMPN法を用いた。イオウ酸化反応の有無は培養液pHの低下で判定した。陽性を示した培養液を、粉末イオウを含むWS5及びWS5Y寒天培地に接種し、コロニー周辺にクリアゾーンを形成したものをイオウ酸化能陽性と判定した。分離株のうち糸状菌株はスライドカルチャー法で簡易同定後、カルモジュリン遺伝子の塩基配列により同定した。

【結果と考察】

グアノ試料18点中10点から高濃度の硝酸及び硫酸イオンを検出し、特に乾燥グアノ5点中4点の硫酸イオン濃度は1800~8100 mg/kgと非常に高かった。雨水が屋根から砂岩ブロックの間隙を浸透していく際に、これら成分が溶出される現象は「人工降雨実験」で先に証明しているが(中村ら, 日本土壤微生物学会つくば大会, 2015)、本研究により、その供給源はグアノである可能性が高いと推察される。イオウ酸化微生物は乾燥グアノ5点ではND~10³ MPN/g乾物, 湿潤グアノ5点では10¹~10⁷ MPN/g乾物の範囲で検出され、後者で菌数がより高い傾向が認められた。分離純化した7株のイオウ酸化糸状菌は、無機塩類のみからなるイオウ寒天培地で発育しクリアゾーンを形成したことから、イオウ酸化に加え、炭酸固定も行う独立栄養菌の可能性がある。遺伝子解析から7株中5株が*Penicillium panissanguineum*の類縁種と同定され、うち3株は1つの独立したグループを作っており、既知菌種に属していないため、新種の可能性がある。

米田 奈央, 江邊 正平, 大池 達矢, 松川 哲也, 岡南 政宏, 梶山 慎一郎, 阿野 貴司
近畿大・院生物理工

〔目的〕 農作物生産において化学農薬による植物病原菌の防除が行われているが、環境への影響が懸念されている。そこで、環境への影響を減らす農薬として微生物などを用いた生物防除剤が注目されており、化学農薬との併用が考えられている。近年、生物防除剤における新たなアプローチとして土壌微生物が生産する揮発性有機化合物Volatile Organic Compounds (以下VOCs)についての研究が行われている。VOCsは土壌間隙中に広く分散し、より広範囲に生息する他の微生物に対して様々な生理活性を及ぼすことができると考えられており、抗真菌活性や植物生長促進作用、植物の抵抗性誘導などの生理活性が確認されている。VOCsの性質や活性をポストハーベスト農薬として利用することで、食料生産における収穫後の損失を減少させることが出来るのではないかと考えた。本研究では、様々な土壌細菌が生産するVOCsの生理活性を調べ、農業利用に対する基礎的知見を得ることを目的とした。〔方法および結果〕 始めに、植物病原菌である *Rhizoctonia solani* を用いて抗菌活性試験を行い、抑制が確認された5株を選抜した。次に、これらの菌株が生産するVOCsの植物病原菌に対する抑制の有無を確認するために、菌株を植菌したプレートと植物病原菌を植菌したプレートを上下に組み合わせて培養することにより試験した。抑制率は、植物病原菌の生育面積から算出した。その結果、研究室保有株5株中4株において、揮発性の抗真菌活性が見られた。そのうち、3株が *R. solani* に対して、90 %以上の抑制を示した。これらの菌株が生産するVOCsの抗真菌活性に関する物質を同定するためにGC/MS分析に供した。現在、これらの菌株を用いて8種の病原菌に対するVOCsによる抗真菌活性試験を行っている。また、セパレートシャーレ上で菌株とシロイヌナズナを共培養したところ植物生長に対する影響が認められたため、VOCsの植物に対する影響について現在検討中である。

齋藤 樹¹, 久保 響子², 斎藤 菜摘²¹鶴岡高専・専攻科・生産システム工学専攻, ²鶴岡高専・創造工学科

近年、資源枯渇が懸念されている中で生分解性プラスチックが注目を集めている。生分解性プラスチックは環境中で微生物により分解して最終的に水と二酸化炭素に分解する性質を持つ、環境への負担が少ない材料である。その原料の一つにポリヒドロキシアルカン酸（PHA）がある。PHAは多くの微生物がリン、窒素源が枯渇し、炭素源が豊富になるとエネルギー源として細胞内に蓄積することが知られている。既知のPHA生産株は主に海洋の光合成細菌や活性汚泥中の β プロテオバクテリアなどが報告されているが、幅広い環境でのPHA生成株の研究はまだ進んでいない。そこで、湖沼や原油などの環境に目を向けることにより、既知のPHA生成株より多くのPHAを生成する微生物株が発見できるのではないかと考えた。本研究では、様々な環境中サンプルからPHAを生成する微生物を単離してPHAの蓄積における最適培養条件の検討を行うことを目的とした。山形県を流れる赤川の河口域の海水、山形県鶴岡市大山上池表層の水、大山下池2 m層の水、水田表層の水、山形県鳥海山由来の原油、原油と共に湧出した地下水採取し、LB培地に直接塗布した。28℃で培養し、コロニー形成確認後、栄養源を制限したPHA生成用培地に植え継いだ。28℃で培養後、Nile Blue AとDAPIを用いてPHAとDNAの二重染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光顕微鏡観察でNile Blue Aの蛍光が確認された細菌のDNAを抽出し、PHA合成酵素の遺伝子（*phaC*）を標的にしてPCRを行った。赤川河口海水から4株、鶴岡市大山下池2 m層から2株、水田表層の水から1株、鳥海原油から3株、原油と共に湧出した地下水から3株の計13株においてNile Blue A染色の蛍光が確認できた。また、下池2 m層由来の株は細胞が大きくかつ他の株より強い蛍光が見られた。13株中、赤川河口海水、原油、原油下の水由来の計3株から*phaC*遺伝子の増幅が確認できた。この3種類の細菌はNile Blue Aによる蛍光が見られた上、*phaC*遺伝子の増幅が確認できたためPHAを生成していると考えられる。今回、河口の海水、湖沼、原油などの環境から発見できたことより、PHAを生成できる微生物は幅広い環境に存在していると考えられる。また、原油由来の株は廃油などを利用したPHAの生成が期待できるのではないかと考えた。

笠井 拓哉, 高妻 篤史, 渡邊 一哉
東葉大・院生命

【背景・目的】 *Shewanella oneidensis* MR-1 株は通性嫌気性の金属還元細菌であり、呼吸の電子受容体として酸素やフマル酸等の可溶性物質に加え、細胞外の固体金属化合物等を利用することが可能である。MR-1 株は金属還元細菌や発電細菌のモデルとして広く研究されており、嫌気呼吸系遺伝子の発現制御にはcyclic AMP receptor protein (CRP) が関与することが明らかになっているが、異化代謝系の発現制御機構に関しては十分に解明されていない。我々は最近、MR-1 株のCRP制御系を解析する過程で *crp* 遺伝子破壊株 (Δcrp) がD-乳酸の資化能を失うことを発見した。そこで本研究では、CRPがD-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) 遺伝子の転写にどのように関与するかを分子生物学的に解析した。

【結果・考察】 MR-1 株のゲノムには2つのD-LDH (DldおよびLdhA) がコードされており、Dldは主にD-乳酸からピルビン酸への酸化反応を触媒するNADH非依存的D-LDH、LdhAは主にピルビン酸からD-乳酸への還元反応を触媒するNADH依存的D-LDHとして働くと考えられている。 Δcrp のD-乳酸代謝能を調べた結果、本変異株はD-乳酸の資化能力に加え、D-乳酸を発酵的に合成する能力を欠損していた。また Δcrp における *dld* と *ldhA* 遺伝子の発現量を定量的RT-PCR解析した結果、これらの遺伝子の発現量が野生株と比較して著しく減少していた。CRPの精製タンパク質と *dld* および *ldhA* 遺伝子上流配列を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、CRPはこれらの遺伝子上流域に特異的に結合した。以上の結果から、CRPは *dld* および *ldhA* 遺伝子の発現を正に制御する転写因子として働くことが示された。CRPは嫌気呼吸系の制御にも関与するため、MR-1 株はCRPを用いてD-乳酸代謝と嫌気呼吸系を協調的に制御していることが明らかとなった。このことは、電子受容体が十分に存在しない嫌気条件において糖などを代謝する際の一時的なelectron sinkとして細菌がD-乳酸を利用すること、呼吸が活発になった際（好気条件など）にはこのバイパスが利用されず、解糖系が（ピルビン酸を介して）直接クエン酸回路に連結されることを示唆している。

廣瀬 篤弥, 高妻 篤史, 渡邊 一哉
東薬大・院生命

【背景、目的】 *Shewanella oneidensis* MR-1 株は通性嫌気性の金属還元細菌であり、呼吸の際の電子受容体として酸素やフマル酸等の可溶性物質に加え、細胞外の不溶性物質（鉱物や電極）も利用することができる。MR-1 株の嫌気呼吸鎖については多くの研究が行われ、電子伝達を担う経路がほぼ同定されている。一方、本株が電子源となる有機物（主に乳酸やピルビン酸等の低分子有機酸）を代謝する経路は十分に解明されていない。MR-1 株は2つのピルビン酸代謝酵素（pyruvate dehydrogenase: pdh と pyruvate formate lyase: pfl）を持ち、嫌気条件下では Pfl を利用し、好気条件下では Pdh を利用すると考えられている。しかし、その切り替えがどのような環境刺激によって生じるのかは不明であった。一方、我々はMR-1 株を異なる電位（+0.3 V と -0.3 V vs. Ag/AgCl）に設定した電極を用いて培養し、そのトランスクリプトームを比較することで、高電位時に Pdh の発現量が上昇することを見出した。この結果から、MR-1 株は電子受容体の酸化還元電位依存的にピルビン酸の異化代謝系を切り替えていると予想された。そこで本研究ではこの仮説を検証するため、関連する遺伝子破壊株を用いて酸化還元電位がピルビン酸の代謝経路に与える影響を解析した。

【結果】 MR-1 の野生株（WT）と Pdh 破壊株（ Δpdh ）を異なる電極電位（高電位: +0.3 V、低電位: -0.2 V）に設定した電気化学セルにおいてピルビン酸を基質として培養した結果、高電位時では Δpdh の電流量が WT よりも減少し、一部のピルビン酸が Pdh を介して代謝されることが明らかとなった。Pdh によってピルビン酸が代謝されると NADH が生じるため、ピルビン酸の酸化に伴って放出された電子は NADH dehydrogenase（NDH）を介して呼吸鎖に流入すると考えられる。そこで NDH の破壊株（ Δndh ）を用いて同様の実験を行った結果、高電位時において Δndh による電流生成が抑制された。さらに WT と Δndh を酸化還元電位が異なる様々な電子受容体（フマル酸、クエン酸鉄、硝酸、二酸化マンガン、酸素）を用いて培養した結果、電子受容体の酸化還元電位が高くなるほど Δndh の増殖が抑制される傾向が見られた。以上の結果から、MR-1 株は電子受容体の酸化還元電位に応じてピルビン酸の異化代謝経路を切り替えており、電位が高くなるにつれて Pdh と Ndh の寄与率が増加することが示唆された。

松岡 友洋, 新谷 政己, 金原 和秀, 吉田 信行
静大院・総合科技

【緒言】*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は、炭素源、窒素源および硫黄源無添加の無機塩固体培地(BM培地)上で良好な生育を示す超低栄養性細菌である。本菌は生育に大気中のCO₂を要求するが、その際に独立栄養性細菌が必要とする光などのエネルギーの添加を必要としないというユニークな特性を示す。また、本菌は低栄養生育時にトレハロースやグリコーゲンといった糖質を細胞内に蓄積することが分かっており、当研究室では微生物バイオマスとしての利用可能性について検討している。一方で、本菌は低栄養条件において固体培養に比して液体培養での生育が極めて悪く、大量に菌体を得ることが困難である。本研究では、固体培養と液体培養について支持体の有無に着目し、支持体としてスポンジを使用した液体培養を試みた。さらに、スポンジ培養で生育した菌体についての生化学的な性質の評価を行い、固体培養で生育した菌体との比較を行った。【方法と結果】500 ml容ビーカー内で12 mlのBM液体培地にN9T-4株をOD₆₆₀=0.002となるように植菌し、6 cm×6 cm×1 cmの大きさに加工した市販のポリウレタン製スポンジに十分に含ませた。30℃で静置培養を行い、4日間培養後のOD₆₆₀を比較した。その結果、スポンジを用いた系ではスポンジを用いない系に比してOD₆₆₀が約2.5倍となった。このことから、スポンジが支持体の役割をなし、低栄養条件下におけるN9T-4株の液体培養での生育を向上させることが示唆された。その後、スポンジの大きさを20 cm×30 cm×1 cmに変え、スケールアップの実験を行ったところ、同様にスポンジの効果を示す結果が得られた。次に、本菌の低栄養生育に関与する鍵酵素の活性を測定し、生化学的な性質の評価を行った。これまでに、DNAマイクロアレイ解析により本菌が低栄養条件で生育する際に高発現するいくつかの遺伝子(*aldA*, *mnoA*, *acs*, *acc*)が同定されている。BM寒天培地および今回構築したスポンジを用いた培養系で生育した菌体についてAldA(アルデヒド脱水素酵素)の酵素活性を測定したところ、スポンジ培養で生育した菌体は10分の1程度の比活性を示した。このことから、固体培養と液体培養で遺伝子発現が異なることが示唆されたため、現在その他の生化学的な性質についても解析を行っている。

栗原 亜実¹, 大林 龍胆², 吉川 博文¹, 渡辺 智¹¹東農大・バイオ, ²国立遺伝研

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下、S. 7942) は酸素発生型の光合成を行う原核藻類である。S. 7942は細胞あたり複数コピーの染色体を有し、大腸菌に比べ高いUV耐性を示すことが分かっている。光合成は光化学系Ⅰ・Ⅱにおいて活性酸素種（以下、ROS）の発生を伴う。ROSはDNAの損傷を引き起こすため、シアノバクテリアは大腸菌や枯草菌等のモデル細菌とは異なるDNA修復機構を持つと考えられる。DNA修復に関わる因子を比較すると、特に一本鎖DNA修復系がシアノバクテリア間において高度に保存されていることがわかった。Single strand binding protein (以下SSB)は一本鎖DNA修復の開始因子であり、GFP融合タンパク質の局在解析からS. 7942において染色体上に局在することが示されている。そこで、DNA傷害を引き起こす各種ストレス下でのSSBの挙動を解析した。GFP融合タンパク質の局在を観察したところ、複製活性の増加とともにSSB-GFPのfoci数が増加した。さらにH₂O₂添加による酸化ストレス下やDNA障害を引き起こすマイトマイシンC（以下、MMC）添加時においてもfoci数の増加が観察された。したがって、SSBは光や酸化ストレスによって引き起こされるDNA損傷ストレスに応答し、ssDNAを保護する機能をもつと考えられた。一方、当研究室グループにおける解析から染色体分布に関与すると知られる*parA*遺伝子をS. 7942において欠失すると、染色体分布に異常が起こること、またUVストレスやMMC添加時に生存率が低下することが分かった。そこで $\Delta parA$ におけるSSB-GFPの局在を観察したところ、 $\Delta parA$ 株ではストレス下のみならず非ストレス下においてもfociは観察されないことが分かった。またSSB-GFPの発現が確認できた。以上のことからParAはSSBの局在に影響を与えていることが示唆された。

横山 心結, 森山 裕理子, 殿内 暁夫
弘前大・院・農

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類醸造など産業に広く用いられている微生物であるが、自然界における生態や分布に関してはほとんど知られていない。*S. cerevisiae* と同属の *S. paradoxus* や *S. mikatae*、または *Schizosaccharomyces japonicus* は自然界から *S. cerevisiae* を分離する際に同時に分離される雑酵母であり、*S. cerevisiae* の分離効率を著しく低下させる要因となっている。自然界に生息する *S. cerevisiae* の利用や生態研究を進める上で分離効率の向上は重要となる。従って、これらの雑酵母を分離工程から排除することで *S. cerevisiae* の分離効率を向上させることを目的に本研究を行った。【方法】白神山地から分離された酵母株 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus*、*S. mikatae*、および *S. japonicus* を用いて集積用培地のエタノール濃度や培養温度に対する増殖特性、および分離用画線培地上での培養性状の差異を解析した。また、コロニーPCRによる簡易同定に有効なプライマーの検討を行った。これら結果に基づき、*S. cerevisiae* 高効率分離用培地と培養条件を決定し、自然界からの分離に適用可能かどうかを検討した。【結果と考察】集積培地のエタノール濃度および温度依存的に雑酵母の生育が抑制された。また、培養温度を37℃とすることで画線培地上での *S. cerevisiae* と雑酵母の培養性状が明確になることが示された。核膜孔複合体タンパク質をコードしている *NUP116* 領域を増幅するプライマーを用いることで *S. cerevisiae* のコロニーPCRによる簡易同定が可能になった。以上の結果に基づいて設計した集積培地と培養条件を白神山地からの *S. cerevisiae* の分離に適用し、30%以上の分離効率で *S. cerevisiae* 株を得ることができた。また、簡易同定された株はすべてが *S. cerevisiae* であり、プライマーの有効性が確認された。現在、本高効率分離法を用いて、*S. cerevisiae* 分離源として最適な試料の検討を行っている。

稲葉 慎之介, 加藤 広海, 大坪 嘉行, 津田 雅孝, 永田 裕二
東北大学・院生命

【背景・目的】 自然環境の大部分は極貧栄養状態であり、このような環境で積極的に増殖する能力も環境細菌の重要な生存戦略と考えられる。我々は、好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株の突然変異株が示す大気中の CO_2 を固定し有機炭素源非添加無機固体培地上で生育する能力（以下、oligotrophic 表現型）に着目し、研究を進めている。これまでの研究で、Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現が本表現型の直接的な要因であることを明らかにし、さらに、(i) UT26 株の *adhX*、および類縁菌株に見出された *adhX* ホモログは可動性遺伝因子支配である可能性が高いこと、(ii) UT26 株に不均衡変異導入法（高い突然変異を誘発させる手法）を適用すると高頻度で *adhX* が高発現した oligotrophic 突然変異株が出現すること、を見出した。以上のことから、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型は、環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応機構のひとつの可能性が高いと考え解析を進めている。【方法・結果および考察】 UT26 株由来 *adhX* 高発現プラスミドを他環境細菌株に導入したところ、UT26 株類縁の *Alphaproteobacteria* のみならず、*Betaproteobacteria* に属する株でも oligotrophic 表現型が観察された。この結果は、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型が環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応機構のひとつである可能性を支持する。また、当該プラスミドの導入の有無に関わらず oligotrophic 表現型を示す株も存在した。これら株では、宿主株が本来有する *adhX* ホモログが機能している可能性が考えられたため、当該株の *adhX* ホモログ破壊株を構築し、現在、その可能性を検討している。一方、不均衡変異導入法によって得られた oligotrophic 突然変異株から任意に3株選抜し、*adhX* 上流の推定プロモーター領域の塩基配列を解析したが、突然変異は確認されなかった。すなわち、シスエレメントの突然変異ではなく、当該領域に結合する発現抑制因子に突然変異が起こっている可能性が示唆された。そこで、現在、レポーター遺伝子 *lacZ* を有する広宿主域プロモーター検索ベクターに当該領域を導入することで、この可能性について検討している。

川口 毅¹, 渡辺 智¹, 成川 礼², 板谷 光奏³, 吉川 博文¹¹東農大・バイオ, ²静岡大・理, ³慶應大・先端生命研

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う原核藻類である。中でも淡水性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下、S. 7942) は自然形質転換能を持ち全ゲノムが解読済みであり、光合成のモデル生物として古くから研究に用いられて来た。S. 7942 は緑色をしており、主に赤色光を光合成に利用する。S. 7942 は海洋性の *Synechococcus* 属と比較的近縁であるが、海洋性 *Synechococcus* の中には赤色、橙色などの種も見つかっている。この多様性の主な要因は、光合成集光アンテナ複合体であるフィコビリソーム (PBS) に含まれるフィコシアニン (以下、PC) と、フィコエリスリン (以下、PE) の量比による。自然環境ではシアノバクテリア間で利用する光の質を変えながら棲み分けを行っていると考えられている。近年、当研究室グループにおいて S. 7942 の効率的なゲノム編集技術を確立した。本研究ではこれを用いて、S. 7942 の PBS を人工的に改変し様々な光質への適応を解析した。 *Synechococcus* sp. WH 7803 (以下、S. 7803) は赤色の海洋性シアノバクテリアであり 25 kb の PE 遺伝子群をゲノムに有している。この PE 遺伝子群を S. 7942 へ組込むコンストラクトを作製し S. 7942 への形質転換を試みた。しかし、全長 25 kb を一挙に導入することはできなかった。この原因の探索をした結果、PE 遺伝子群内のフィコエリスロビリリン (以下、PEB) 合成酵素 (*pebAB*) を誘導発現すると生育が顕著に阻害されることを見出した。また、*pebAB* 誘導時は S. 7942 の菌体の色が、緑色から茶色に変化し、クロロフィルの異常な分布が観察された。この茶色になった株のスペクトルを計測した結果、野生株と比べてフィコシアノビリリン (以下、PCB) の量が減少し、PEB の量が増加していることが分かった。また、細胞を破碎し、抽出液を SDS-PAGE によって展開すると、PEB が色素結合タンパク質である CpcA に結合していることが確認できた。*pebAB* を誘導発現したまま、培養液を植え継ぐと、菌体の色は茶色から、さらにオレンジ色に変化した。 *pebAB* 誘導株の増殖と光波長との関係を明らかにするため、現在、様々な光条件での培養を試みている。

鈴木 研志¹, 本荘 雅宏², 西村 朋香³, ファティマ アズワニ⁴, 田代 陽介², ニ又 裕之^{2, 5}

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

地球上の様々な環境において、微生物は限られた栄養源を獲得することで増殖し、他の微生物と相互作用することで複雑な微生物生態系を構築している。微生物生態系は、系内外の環境変化に適応するため群集構造を変化させながら、生態系としての機能を発揮している。この微生物群集構造変遷および機能維持機構の解明は微生物利用技術の発展に寄与すると同時に、微生物生態学的知見として極めて興味深い。本研究室ではこれまでphenolを唯一の炭素源とした、*Pseudomonas* sp. C8株、*Ralstonia* sp. P-10株および*Comamonas testosteroni* R2株を用いた合成微生物生態系を構築し動態解析を行った。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が高い微生物が優占化し、他の微生物は淘汰されてしまう。しかし、この合成微生物生態系において三菌株は共存することが明らかとなった。このような競争理論のみでは説明できない群集構造の変動、即ち種の共存機構こそが微生物生態系における環境変化に対応する群集構造の柔軟性と機能的恒常性を維持する基盤原則であると考えられた。そこで共存機構を解明するため、P-10株およびR2株用いphenolを唯一の炭素源とした純粋培養系および二菌株混合培養系を構築し動態解析を行った。その結果、P-10株純粋培養系はphenol分解という機能を維持した一方で、R2株純粋培養系では徐々にphenolが蓄積しシステムの崩壊が確認された。競争理論によればR2株の競争力はP-10株より低く、R2株は混合培養系において淘汰されると考えられた。しかし、混合培養系では培養開始から52日目まで二菌株が同程度の菌密度で共存した。また、phenol負荷量の低下に伴いP-10株が優占化し、さらに負荷量を低下させることでR2株が優占化した。興味深いことに、phenolおよびcatecholに対する動力学的解析の結果、P-10およびR2株混合培養系において、P-10株がphenolを分解し、代謝産物であるcatecholを二菌株で共有している様が観察された。そこで、phenol代謝関連遺伝子の発現解析を行ったところ、phenol hydroxylase遺伝子はP-10株のみで発現しており、他の遺伝子は両菌株で発現していた。以上の結果から、種の共存は代謝産物の分配により構築されたネットワークの上に成立しており、環境変化に応じたネットワークの変化が群集構造変遷として観測されているのではないかと推察された。

酢酸生成菌は還元的アセチルCoA経路によって主に酢酸を生産する嫌気性細菌のグループであり、従属栄養的・独立栄養的な種々の代謝をつうじて地球上の多様な嫌気環境における有機物分解過程に関与している。酢酸生成菌は代謝で生じた還元力を使用し、CO₂の他にも硝酸やチオ硫酸といった溶解性の電子受容体を還元できることが知られている。しかし、様々な嫌気環境において豊富に見られる酸化鉄などの不溶性の電子受容体を還元できる能力については明らかにされていない。一方、最近の研究によって、ある種の酢酸生成菌は金属鉄などの固体状の電子供与体から直接的に電子を獲得できることが示唆され、独特の細胞外電子伝達機構を有する可能性が示された。本研究では、直接的な電子獲得能が調べられた酢酸生成菌を対象に、不溶性の酸化鉄を還元する能力と、それを可能にする分子機構を比較ゲノム的手法から明らかにすることを目的とした。

4種類の酢酸生成菌(*Sporomusa* sp. GT1株、*Sporomusa sphaeroides*、*Sporomusa ovata*、*Acetobacterium woodii*)を、基質としてエタノール、またはH₂+CO₂ (80:20, v/v)の存在下、固体状酸化鉄としてフェリハイドライト(FeO(OH))を添加した培地で静置培養した。その結果、基質の種類によらず、どの酢酸生成菌を用いた培養でも、増殖に伴い培地中の酢酸と二価鉄濃度の上昇が観察され、微生物代謝による酸化鉄還元が示唆された。4種の酢酸生成菌はほぼ同等の酢酸生成速度を示したが、酸化鉄還元速度は*Sporomusa* sp. GT1株と*S. sphaeroides*でほぼ同等であり、次いで*S. ovata*、そして*A. woodii*の順で減少した。興味深いことに、この還元能の順序は、先行研究で報告されている金属鉄酸化能のそれと一致しており、直接的な電子の放出過程と獲得過程では共通の機構が寄与している可能性が示唆された。また培養の条件によってはフェリハイドライトの還元に伴うマグネタイト(Fe₃O₄)の形成が確認され、酢酸生成菌の代謝が鉄鉱物の相変化に寄与しうることが示された。現在、細胞外電子伝達機構の解明に向け、4種類の酢酸生成菌についての比較ゲノム解析を行っている。

兼崎 友¹, 樋山 智恵美², 宮澤 和己², 渡辺 智², 吉川 博文²¹東京農業大学・ゲノムセンター, ²東京農業大学・生命科学

一般的に至適生育温度が45℃以上、あるいは生育限界温度が55℃以上の微生物は中等度好熱菌と呼ばれる。シアノバクテリアの中には *Thermosynechococcus* 属のように、温泉から単離された至適生育温度57℃の好熱性の種も存在しているが、どのような遺伝的形質が常温性と好熱性のシアノバクテリアのニッチを隔てているのかはよく分かっていない。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942は常温性のシアノバクテリアであり、その生育上限温度は43℃であることが知られる。44℃以上の高温条件に曝すと、野生株であっても分裂異常によりフィラメント状になり細胞増殖の抑制が観測される。また僅か20分間、50℃に曝しただけでも細胞の生存率は50%まで低下する。これまでにシアノバクテリア *S. elongatus* PCC 7942において、HspA, HtpG, DnaK, DnaJ, GroESLなどの熱ショックタンパク質群やHik34, HrcAなどの高温誘導性遺伝子の発現制御因子が見つかったが、遺伝子組換え実験系を用いても45℃以上での連続培養に成功した例はない。そこで我々は、全ゲノムリシーケンス解析により完全ゲノム情報を把握した *S. elongatus* PCC 7942 TUA株をベースに、高温順化を繰り返しながら長期培養をおこない、「45℃の壁」を超える突然変異株を作出できるかどうか試みた。BG-11寒天培地上で生育上限温度での培養を継続し、定期的に6時間程度、1℃高い培養温度に曝す処理を繰り返した結果、培養開始より2ヶ月の段階で45℃、4ヶ月の段階で48℃、そして8ヶ月の段階では50℃での連続培養が可能な変異株が取得できた。トランスクリプトーム解析の結果からも、この高温適応株では遺伝子発現プロファイルが親株に比べ大きく変動しており、これらの株を全ゲノムリシーケンス解析した結果、これまでに高温耐性との関わりが報告されていない複数の遺伝子座への変異を発見した。一方、この株は液体BG11培地での1% CO₂通気下での培養時には47℃までしか生育できなかった。分子生物学的手法により高温耐性の獲得に寄与した遺伝子座の同定を進めた結果、現在までに2つの候補遺伝子が得られている。このような自然突然変異の累積により得られる適応進化株は、遺伝子組換えによらない微生物育種法として藻類・微生物によるバイオマス物質生産にも応用可能と考えている。

加藤 浩

三重大学 地域イノベーション推進機構 先端科学研究支援センター 植物機能ゲノミクス部門

シアノバクテリア（藍藻）の中でも陸棲藍藻は乾燥に耐えられることが知られている。陸棲藍藻の例として世界の至る所に存在するイシクラゲ(*Nostoc commune*)が知られている。自然界にあるイシクラゲから藍藻を単離しているが、寒天培地で増殖できても液体培地では増殖しにくい場合もある。また、培地によって単離できる株が異なる可能性は高く、培地条件を検討する必要がある。そこで、自然界から単離した藍藻を用いて培地条件を検討した。本研究では藍藻でよく用いられる培地をもとに検討し、その結果について報告する予定である。

安藤 翔太¹, 由井 嵐士¹, 片桐 美紀², 田代 陽介¹, 二又 裕之^{1, 3}¹静大院・総合科技, ²静大・工, ³静大・グリーン研

細胞外電子伝達（EET：Extracellular Electron Transfer）は、微生物が固体の導電体に電子受容体として電子を渡す呼吸形態の一種である。EET機構は、微生物を用いた物質・エネルギー生産といった工学的利用のみならず、有機物や光合成の影響が及ばない深海海底土圏における微生物生態系の重要なエネルギー獲得機構としても想起されている。これまでに我々は、蓄電性を有するミネラルを生産する微生物を微生物燃料電池の負電極表面から嫌氣的に分離し、16S rRNA遺伝子の解析結果から硫酸還元細菌*Desulfovibrio* sp.と同定され、HK-II株と命名した。硫酸還元細菌のEETに関する知見は非常に乏しい。そこでHK-II株のEET能力について評価し、その機構について若干の知見を得たので報告する。まず、HK-II株がEET機構を有するかどうか確認するため、カーボングラファイトを負電極とする微生物燃料電池を構築し乳酸を電子供与体として添加した。その結果、乳酸の減少に伴う電流生産が確認された。EET機構をさらに解析するため、掃引速度を変化させてサイクリックボルタンメトリー解析を行った結果、掃引速度の平方根とピーク電流密度の間に高い相関関係が確認された。そのため、HK-II株はメディエーターを介した間接型EETを行うことが示唆された。さらに電極呼吸条件下で培養したHK-II株を回収し、タンパク質分画後SDS-PAGEを行った結果、電極呼吸時には75~135 kDaのタンパク質を特異的に発現し、それらのタンパク質が外膜に局在していることが示唆された。以上のことから、HK-II株は環境の変化を認識して代謝を切り替え、特異的なタンパク質を発現させながら間接型EETを行うことが推察された。興味深い事に、HK-II株は硫酸呼吸条件下で培養すると酢酸を蓄積する不完全酸化型であるにも関わらず、電極呼吸時では酢酸は減少傾向にあり完全酸化型へ移行可能であることが示唆された。HK-II株のゲノム解析結果からも、本株が完全酸化型代謝に必要なcarbon monoxide dehydrogenase遺伝子を有していることが示されている。以上の結果から、硫酸還元細菌HK-II株にとってEET機構は細胞外環境に柔軟に適應するための生存戦略であると考えられる。

猪原 英之¹, 堀 知行², 青柳 智³, 高崎 みつる³, 片山 葉子⁴¹東京農工大・院連合農学, ²産総研・環境管理, ³石巻専修大・理工, ⁴東京農工大・院農

【背景】硫化カルボニル（以下COS）は対流圏の硫黄化合物の中で最も多く存在する化合物であり、火山ガスや海底の熱水噴出孔周辺からも高濃度のCOSが検出されている。本研究室では*Thiobacillus thioparus*がCOSaseを用いてCOSをCO₂と硫化水素に分解することを明らかにしている。さらに、その分解産物である硫化水素をエネルギー源とすることから、COSは独立栄養性の硫黄酸化細菌にとって、炭素源、エネルギー源として重要な化合物である。海洋性硫黄酸化細菌にとってもCOSは重要な化合物の一つであると考えられるが、その代謝については不明である。本研究室では東日本大震災に伴った津波堆積物から、3株の海洋性硫黄酸化細菌を分離している。16S rRNA遺伝子の塩基配列から、TSL1株及びTSL6株はEpsilonproteobacteria網の*Sulfurovum aggregans*に、TSL3株はGammaproteobacteria網の*Thiomicrospira crunogena*に近縁であると推定された。しかし、TSL1、TSL6株は*S. aggregans*とは酸素要求性などの性質において異なる特徴を示し、生理的性質を更に調べる必要がある。本研究は、これらの海洋性硫黄酸化細菌の生理的性質を明らかにするとともに、COS分解活性についても調べることを目的とした。【方法】TSL1、TSL6株の生理的性質として、糖類、有機酸、アミノ酸、アルコール類などの13種類の有機化合物の資化性及び嫌氣的条件下での生育を調べた。COS分解に用いる菌体は、チオ硫酸塩をエネルギー源とする無機塩培地を用いて好氣的条件下で培養した。菌体を遠心分離によって回収し、無機塩培地で2回洗浄後、細胞懸濁液とした。気相に30 ppmvとなるようにCOSを添加し、COS濃度の変化をFPD-GCを用いて定量することでCOSの分解活性を求めた。また、チオ硫酸塩の有無によるCOS分解への影響を確認した。【結果】有機化合物について調べた限りでは、TSL1、TSL6株にはこれらを利用した従属栄養の生育は確認されなかった。また、嫌氣的条件下では生育することができず、偏性好気性の化学合成独立栄養性硫黄酸化細菌であることが確認された。供試した3菌株はいずれもチオ硫酸塩が存在していない場合、COSを分解せず、この特徴は本研究室がこれまで報告してきたCOSaseによってCOS分解を行う*T. thioparus*などの細菌とは異なっていた。一方で、チオ硫酸塩の存在下ではCOSを分解することが示され、COS分解のためには硫黄酸化を行う必要があることが示唆された。

Cristina Sanchez Gomez, Kiwamu Minamisawa
Tohoku University

Bradyrhizobium oligotrophicum S58 is a nitrogen (N₂)-fixing oligotrophic bacterium isolated from paddy field soil that carries a set of genes for complete denitrification of nitrate (NO₃⁻) to N₂. S58 is one of the recently identified organisms carrying both nirK and nirS genes, encoding the copper-containing nitrite reductase (NirK) and the cytochrome cd1 variant (NirS), respectively. Here, we characterize the function of nirK and nirS in denitrification of free-living S58. Nitrate-dependent growth and Nir activity levels of nirK- and nirS- mutants under microaerobiosis (~2% oxygen) and anaerobiosis (~0% oxygen), were similar to that in the wild-type S58. However, the nirK-S- double mutant showed a defect in NO₃⁻-dependent microaerobic and anaerobic growth that was concomitant to low or undetectable levels of Nir activity and nitrite (NO₂⁻) accumulation in the medium by the end of the growth period. Such effects were more drastic under anaerobiosis than under microaerobiosis. Accumulation of NO₂⁻ in the growth medium was likely affecting the growth of nirKS mutant strain. Taken together, these data show that NirK and NirS are functionally redundant in S58 under microaerobic and anaerobic denitrifying free-living conditions.

Arthur Fernandes Siqueira, Cristina Sánchez, 南澤 究

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-2-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

Bradyrhizobium diazoefficiens can reduce nitrate sequentially into nitrogen ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$). However, this process in *Bradyrhizobium japonicum* is incomplete ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) due to the absence of *nos* gene cluster, responsible for last step of denitrification. Primary tests in *B. diazoefficiens* and *B. japonicum* (26 strains in total) showed that *B. diazoefficiens* had a significantly higher growth than that of *B. japonicum* strains in anaerobiosis with nitrate, indicating a possible difference in denitrification performance. Physiological, enzymatic and gene expression assays conducted in 2 strains of *B. japonicum* and 3 strains of *B. diazoefficiens* indicated that the absence of *nos* genes is not responsible for low performance in denitrification observed in *B. japonicum*. Further, nitrate consumption and periplasmic nitrate reductase (NapA) activity in *B. japonicum* strains were lower rather than *B. diazoefficiens* under anaerobic nitrate-respiring condition, indicating that the low activity of NapA may be the cause of lower performance of *B. japonicum*. Also, in a way to compensate this low activity, in *B. japonicum*, *nirK* and *norB* (encoding nitrite reductase and nitric oxide reductase, respectively) had higher relative expression than *napA*. This gives keys for understand the occurrence of these species in the soil.

内山/Uchiyama 茂/Shigeru¹, 磯島/Isoshima 隆史/Takashi², 中村/Nakamura 振一郎/Shinichiro¹¹理研・中村特別研究室, ²理研・伊藤ナノ医工学研究室

【背景・目的】表面を微細な凹凸構造にした寒天培地上に形成される微生物コロニーの広がり方について検討した知見はこれまでほとんどない。本研究では基質の表面構造だけによる微生物の培養制御の実現を目指して、微細な凹凸構造を形成させた様々なシリコン型を転写して作製した微細表面構造を有する寒天培地上に枯草菌などの微生物をコロニー形成させて平滑な寒天培地におけるコロニーと比較した。【方法及び結果】ハスやサトイモの葉などの天然物、目の粗さの異なるサンドペーパー、メッシュクロスなどの表面素材を直径9cmのプラスチック製ペトリ皿の底の内側片半面に貼り付け、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樹脂型を作製した。寒天培地への表面形状の転写は溶けた寒天培地にシリコン型を接触させ固化後に剥がすことで行った。1×10⁵ CFU/mlに調整した菌懸濁液1 μlを寒天培地上に点接種し30℃で3~5日間培養してコロニーを形成させた。その結果、コロニーの拡大速度に寒天培地表面の形状が影響していることが明確であり、場合によってはコロニーが薄く速やかに拡大したり逆に縮小することもあり、基質の表面形状によって微生物の増殖をある程度制御できる可能性が示唆された。現在、ガラス基板に塗布したフォトレジスト（AZ1500）でフォトリソグラフィによって一次的な線状パターンや二次元的な格子状パターンなどの原型を作製し、シリコン樹脂型を経て寒天培地表面に転写して、寒天培地表面の微細構造の微生物のコロニー形成や増殖速度への影響とサイズ効果や形状効果などを調べている。結果は当日発表する。

小柳/Koyanagi 勇/Isamu¹, 藤原 健智²¹静岡大大学院総合科学技術研究科理学専攻生物科学コース, ²静岡大学創造科学技術大学院自然科学系教育部環境エネルギーシステム専攻

通性嫌気性のバクテリアでは、酸素センサーとして機能するFNRやFixLJ等の転写因子が嫌氣的代謝の誘導を制御している。好塩性アーキアの多くの種も通性嫌気性であるが、FNRやFixLJによる制御系は存在しない。しかし*Haloferax volcanii*を用いた分析の結果、NarOと命名された好塩性アーキアに特有のDNA結合タンパク質が、嫌気条件下での脱窒（硝酸塩呼吸）の誘導を制御していることが遺伝子破壊実験によって示されている（Hattori *et al.* 2016）。またNarOには、ホモログがさらに3種（DmsR、NarO2、NarO3）存在するが、DmsRはDMSO呼吸の、またNarO2はフマル酸呼吸の誘導制御に関与していることがそれぞれ示されている（Qi *et al.* 2016; 金ら2015）。そこで私は、これらの機能、およびその相関関係の解明を目的として、NarOホモログ4種すべての組み合わせについて遺伝子破壊株（全15種：単独4、二重6、三重4、四重1）を作成した。次に増殖能を網羅的に比較解析するために考案したマイクロプレート培養法を用い、様々な条件下で培養実験を行った。その結果、①呼吸基質として硝酸塩を単独に加え脱窒条件下で嫌気培養した場合、*narO*遺伝子の破壊によってのみ脱窒能は失われ、他の3種の遺伝子の有無には影響されないこと、②DMSOを単独に加えた場合、*dmsR*遺伝子の破壊によってのみDMSO呼吸能は失われること、③フマル酸呼吸能は、*narO*遺伝子、あるいは*narO2*遺伝子の破壊によって部分的に、また*narO*遺伝子と*narO2*遺伝子の二重破壊によって完全に失われること等が確かめられたが、これまでのところNarO3の機能についての手がかりは得られていない。一方、呼吸基質として硝酸塩とDMSOを同時に加え嫌気培養を行ったところ、親株であるH26では、硝酸塩濃度依存的にDMSO呼吸による増殖が抑制されること、しかし*narO*遺伝子破壊株ではそのような抑制は起こらないことを見出した。この結果は、大腸菌等のバクテリアと同様に、アーキアにおいても硝酸塩によってDMSO呼吸能が抑制されることを示し、またその抑制にはNarOが関与していることが明らかとなった。

荒木 琢磨¹, 小杉 直樹², 藤田 純平³, 田中 達², 藤原 健智¹¹静岡大・創造科学技術大学院, ²静岡大・院・理学研究科, ³静岡大・理学部

Halophilic euryarchaea lack many of the functional genes necessary for the 'classic' heme biosynthesis pathway previously identified in animals and plants. Bioinformatic analysis suggested the presence of two heme biosynthetic processes, a HemQ pathway and an alternative heme biosynthesis (*ahb*) pathway, in *Haloferax volcanii*. PitA is specific to the halophilic archaea and has a unique molecular structure in which the HemQ domain is joined to the antibiotics biosynthesis monooxygenase (ABM)-like domain by a His-rich linker sequence. The *pitA* gene deletion variant of *H. volcanii* showed a phenotype with significant reduction of aerobic growth. Addition of a protoheme complemented the phenotype, supporting the assumption that PitA participates in the aerobic heme biosynthesis. Deletion of the *AhbD* gene caused a significant reduction of only anaerobic growth by denitrification or dimethylsulfoxide (DMSO) respiration, and the growth was also complemented by addition of a protoheme. The experimental results suggest that the two heme biosynthesis pathways are utilized selectively under aerobic and anaerobic conditions in *H. volcanii*. The molecular structure and physiological function of PitA are also discussed on the basis of the limited proteolysis and sequence analysis.

倉品/Kurashina 佐武郎/saburo, 亀田/Kameda 晋矢/Shinya
株式会社 菱六 研究室

弊社は京都市で種麴の製造・販売を行っている種麴屋である。種麴は通常米に麴菌*A.oryzae*や*A.sojae*などの胞子を十分に着生させたものである。種麴と麴は一般的に混同されやすいが、酵素の利用を目的とする麴とは異なり、種麴は*A.oryzae*などの胞子を利用するための目的で製造されたものである。日本酒や味噌などの製造の用途に応じ、多くの種類の種麴が製品として製造、販売されている。

弊社が保有している*A.oryzae*実用株の中には菌核を形成する株が含まれている。*A.oryzae*は今まで有性世代が確認されておらず、近縁の*A.flavus*や*A.nidulans*が形成する閉子嚢殻に似た菌核を形成することが知られている。*A.oryzae*実用株の菌核形成については、まだわずかな研究のみである。一般的に菌核は菌糸が凝集し形成される。またCzapek dox寒天培地（以下CD培地）において菌核を形成する株は、通常種麴の製造と同一条件下である蒸米米粒上で菌核形成を行わない。これは弊社の種麴製造においても既に確認されている。麴や種麴の蒸米米粒上の菌糸の伸長は酵素生産、胞子形成の重要な要因であり、菌核形成過程と麴や種麴の培養条件の関連にも興味を持たれる。

本研究では弊社が保有する*A.oryzae*の中から菌核を形成する株を3株選抜した。保有する*A.oryzae*実用株すべてが菌核形成を行うことはなく、選抜した3株の菌株形成株それぞれCD培地上において菌核形成数や胞子量が異なった。菌核形成株はCD培地上で直径1.0mm前後の菌核を形成する。CD培地上においては1.0mm以上の大型の菌核は形成されず、30℃の培養時には72時間前後で菌糸の凝集体が形成され120時間前後で黒く成熟した。SEMまたは光学顕微鏡による菌核内部の観察においても成熟した菌核の内部に有性胞子様の構造体は確認されなかった。さらにスライドカルチャー法を用いて接種からの経時的な菌核形成株の菌糸の成長や菌核形成過程を観察した。Yeast extract1.0%をCD培地に添加すると菌核形成数は有意に上昇するが、CD最少培地では菌核形成数は減少し*A.oryzae*実用株は貧栄養環境において菌核形成が抑制された。CD培地以外の蒸米やお粥等の培養基質を用い窒素源やpHを調整した培地における広範な条件の培養を行い、菌核形成条件を検討した結果を報告する。

栗栖 萌¹, 黒沢 則夫¹, Antonius Suwanto²¹創価大学大学院 工学研究科 環境共生工学専攻, ²Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia.

代表的な発酵微生物の一つである乳酸菌は、バクテリオシンなどの抗菌物質を産出する種が存在することから、天然抗菌物質のリソースとして注目されている。バクテリオシンは、細菌が産生する抗菌性ペプチドであり、主に生産菌の類縁種などに抗菌効果を示す。発酵食品から見いだされる乳酸菌由来のバクテリオシンは、安全性が高いと考えられ、食品保存料として適している。しかし実用化されているのはナイシンのみであるため、多様なバクテリオシンの探索と実用化が望まれている。本研究では、インドネシアの大豆発酵食品であるテンペとその中間製品を分離源として、抗菌活性を有する新たな乳酸菌株およびバクテリオシンの取得を目的として実験を行った。インドネシアの家庭およびテンペ製造所から、真菌植菌前大豆、発酵途中のテンペ、成熟テンペを入手した。これらの上澄みまたは生理的食塩水懸濁液をGYP-BCPプレート上に植菌し、32℃で嫌気培養を行った。その結果、13株の酸生成菌が分離され、それらは16S rDNA塩基配列に基づき4属5種の非病原性または病原性の低い乳酸菌に分類された。それぞれの菌株の培養液上清について抗菌活性試験を行った結果、*Lactobacillus delbrueckii* に帰属されたMKT11株とMKT14株由来の培養液上清が、*Listeria innocua* に対する生育阻害活性を示した。いずれの抗菌活性もプロテアーゼ処理によって消失したことから、両株由来の抗菌活性物質はバクテリオシンであると推定した。より安定に抗菌活性を示したMKT11株について、抗菌活性物質の最適産生条件を調べた結果、32℃培養で定常期に入ったときの培養液上清が、*L. innocua* に対する最も高い生育阻害活性を示した。本株が産生するバクテリオシンと推定される抗菌活性物質について、アミノ酸配列の解析とより詳細な抗菌スペクトルの調査などが今後の課題である。

平井 智美, 近藤 陽香, 川澄 俊之
日本女子大・食物

【目的】自然界ならびに発酵食品中において、乳酸酸性環境は多く知られており過酷な環境ながら多種の微生物が共存し、相互作用を行いながら生存していると推測される。当研究室では、漬物由来の乳酸菌*Lactobacillus paracasei* N9株（以下N9株）と酵母*Meyerozyma guilliermondii* K25株（以下K25株）が、乳酸水溶液中（pH3.0）で著しく共凝集することを見出し、共凝集によりN9株の死滅が抑制されることを確認した¹⁾。本研究では、乳酸酸性環境下における乳酸菌と酵母の共凝集現象について、関連因子や生存率への影響などを複数種の乳酸菌株を用い検討した。

【方法】乳酸水溶液（pH3.0）に懸濁した乳酸菌と酵母（10：1）について、懸濁後30分間の凝集性を目視と顕微鏡観察で評価した。供試菌株は当研究室保有菌株の中でK25株と凝集がみられた*Lactobacillus pentosus* N1株（以下N1株）、*Lactobacillus sakei* 171株（以下171株）、*Lactobacillus brevis* 133株（以下133株）を用いた。凝集因子探索の為、乳酸菌体のトリプシン処理による凝集能の変化の観察、表層タンパク質の抽出とSDS-PAGEによる分析を行った。乳酸菌の生存率測定はコロニー計数法で行い、さらに、N1株からは非凝集性の自然変異株（以下N1Mt株）を取得し、これについても生存率変化を測定、親株と比較した。

【結果・考察】共凝集因子について、N1株、171株、133株のトリプシン処理によりK25株との共凝集能が失われたことから、共凝集には乳酸菌表層のタンパク質が関与していることが考えられ、この因子について現在精査中である。生存率について、N1株と171株はN9株と同様、K25株との共凝集によって単独に比べて死滅が抑制された。しかし、共凝集する酵母の生死によって乳酸菌の死滅抑制効果は異なり、171株では死滅酵母によっても効果が見られたが、N1株ではN9株と同様に死滅酵母による効果は見られなかった。N1Mt株はN1株と比較し死滅自体が遅くなる傾向が見られ、N1株と同様に単独よりも酵母との共存下において死滅が抑制された。以上の結果から乳酸酸性環境下においても、微生物間での様々な相互作用が行われ、個々に適応生存していることが示唆された。また、菌株によってその効果は多様であり、今後はさらに検討菌株数を増やし、共通性などの菌株特異的な点を明らかにしていく予定である。1) 近藤陽香ら、日本農芸化学会2017年度大会

畑山 耕太¹, 及川 タ里香², 伊藤 博之^{1, 3}¹相模中研, ²北里大・理, ³東ソー

家庭などで快適な室温を維持するためにはエアコンは不可欠であるが、エアコン内の微生物は室内環境の快適性や衛生に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、その実態は不明な部分が多い。そこで、本研究では次世代シーケンサーを用いて家庭用エアコン4台に存在する微生物の群集構造解析を行った。1階の部屋に設置されたエアコンでは、フィルターから様々なバクテリアが検出されたが、熱交換器からはMethylobacterium属またはSphingomonadaceae科のバクテリアが主に検出された。5階または12階の部屋に設置されたエアコンでは、フィルターと熱交換器の両方から検出されたバクテリアのほとんどがEnterobacteriaceae科に属した。Enterobacteriaceae科バクテリアは、トイレ使用により発生するエアロゾルに由来した可能性が考えられた。本研究の結果から、エアコンを汚染するバクテリアの群集構造は、エアコンの設置階数に関連がある可能性が考えられた。地上に近い低層階の部屋に設置されたエアコンは室外からの様々なバクテリアにより汚染されるが、地上から離れた高層階の部屋に設置されたエアコンは室外からのバクテリア汚染を受けにくいことが考えられた。一方、エアコンに存在した菌類の群集構造とエアコンの設置階数には関連性は認められなかった。エアコンによって菌類の群集構造は異なり、Aspergillus属、Cladosporium属、Toxicocladosporium属などが検出された。エアコンの運転により微生物が室内へ拡散されることも懸念され、エアコンの清掃などによる微生物の制御が衛生面から重要であると考えられた。

窪崎 敦隆¹, 渡辺 麻衣子¹, 野地 歩², 吉成 知也¹, 久保 文¹, 南 千紘¹,
小林 直樹², 小西 良子², 石毛 太郎³, 佐々木 剛⁴, 寺嶋 淳¹

¹国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部, ²麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科, ³東京農業大学 生物資源ゲノム
解析センター, ⁴東京農業大学 農学部 バイオセラピー学科

食品や製菓の製造現場、居住空間などの微生物検査には、培養法が用いられているが、全ての微生物を一度に増殖させる培養条件が無く、結果を得るまでに時間がかかることなどの問題点が指摘されている。そこで、微生物迅速試験法の一つとして、技術革新が進んでいる次世代シーケンサーを用いた微生物の網羅的推定法の活用が期待されている。微生物の標的配列を増幅し、塩基配列情報を網羅的に解析するアンプリコンシーケンスを代替法として活用する為には、従来法と同等以上の能力を有していることを検証すると共に、その検出特性を十分に理解する必要があると考えられる。そこで、本研究では、細菌の検査に比べると検証実験実績の蓄積が少ない真菌に着目し、培養検査とアンプリコンシーケンス解析を比較することにした。まず、関東にある6軒の住宅の寝室より室内塵を回収し検体とした。培養検査の為に、室内塵重量当たり10倍量の溶液に懸濁することで検体原液を作製し、検体原液および段階希釈液をDG-18寒天培地上で培養した。培養4日目および7日目に、コロニー数および菌属を記録し、室内塵中の真菌の推定を行った。一方、アンプリコンシーケンス解析の為に、検体原液、培養4日目および7日目の寒天培地の掻き取り溶液からDNAを回収した。精製されたDNAを鋳型に、我々が構築した細菌・真菌の同時検出用のプライマーセットおよび真菌検出用のプライマーセットで増幅産物を作製し、次世代シーケンス用のライブラリの調整に供した。作製されたシーケンスライブラリはMiSeqを用いて両端300塩基を決定し、CLC Genomics WorkbenchおよびMetagenome@KINを用いて解析した。その結果、培養4日目および7日目に培養検査で観察された菌属が、アンプリコンシーケンス解析においても推定できることが明らかになった。一方、検体原液に含まれる細菌と真菌を同時に検討できること、DG-18寒天培地では培養が困難な真菌も検出できることなど、アンプリコンシーケンス解析結果は、培養検査では得難い情報を含んでいた。本発表では、解析結果の詳細を報告すると共に、従来法の代替法としてのアンプリコンシーケンス解析の可能性について議論することになっている。

藤吉 奏, 丸山 史人
京大・院医

特定環境下での生物間相互作用は、その環境が変われば変化する。そのため特定の（微）生物が増殖すると、それに付随して（微）生物が増減することはよく知られている。ヒトが多くの時間を過ごす生活環境には多様な微生物が生息しており、その中には病原細菌も含まれる。日本やアメリカなど先進国の感染症として近年問題となっているレジオネラや緑膿菌、非結核性抗酸菌は日和見感染の原因菌であり、その特徴は、宿主であるヒトの免疫力が低下した時、またはこれら細菌に高濃度で暴露された際に感染・発症することである。これらの菌は生活空間の中に普通に存在し完全に除去することが難しいため、優占的に繁殖させないことが感染のリスクを下げる上で重要である。すなわち生活環境における細菌群集構造の動態を把握することは、衛生微生物管理と疾病の予防対策を行うためにも重要である。塩基配列を用いた細菌群集構造の解析は進歩しており、例えば野外や宇宙でも配列を決定できる小型のシーケンサー（MinION）が2012年にOxford Nanopore社より発表された。本研究では、実験器具のない家庭環境で細菌群集構造の動態を捉えることを目指し、従来のDNA解析手法と本装置で行った解析結果について、精度と再現性の評価を実施した。生活環境の中でも、特にレジオネラや非結核性抗酸菌など細菌による健康被害が報告されている、浴室のシャワーヘッドおよび循環口からバイオフィルムを採取した試料からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子配列の保存領域を対象にしてPCRを行い、本領域全長を取得、そしてMinIONおよびMiSeqを用いて細菌群集構造を解析した。細菌群集構造解析は、(1)菌細胞の採取、(2) DNAの抽出、(3) PCR、(4)電気泳動、(5)シーケンスの5ステップから構成されている。現在、(1) — (5) の作業に必要な装置一式を全てスーツケースに詰め込むことができることから、使用場所を移動して野外で全ての作業を行うことが可能である。ポータブルDNAシーケンサーを詰め込んだこのスーツケースが普及すれば、Do It Yourself (DIY) で自宅、野外等のどこでも遺伝子配列解析を行うという新たな新しい文化の創成につながるだけでなく、生活環境の微生物生態の理解や衛生管理にも役立てることができる。

伊藤 雅¹, 安達 啓一¹, 廣瀬 絵美¹, 中村 範子¹, 秦 真美¹, 安井 善宏¹, 松本 昌門¹, 山下 照夫², 皆川 洋子¹
¹愛知県衛生研究所生物学部ウイルス研究室, ²修文大学 健康栄養学部

【目的】消毒前の流入下水から検出される腸管系ウイルスは、地域の不顕性を含む腸管系感染症の推移を反映する指標となることが想定される。感染症発生動向調査の一環として、当所は県内病原体定点医療機関で主に小児患者から採取された検体中の病原ウイルス検索を担当している。本研究では、流入下水と患者検体から細胞培養法で検出される腸管系ウイルスの比較解析を行った。【材料及び方法】2001～2016年に毎週1回程度採水された流入下水（770件）50mLを低速遠心後、上清をPEG沈殿法にて10倍濃縮し検体とした。ウイルス分離はVero、Hela、RD細胞に接種後、2～4週間観察を行った。分離ウイルスは中和法又は遺伝子検出法で同定型別した。発生動向調査では下水調査期間中に検出されたウイルスについて比較対象とした。一部のエンテロウイルス(EV)は構造領域の塩基配列を決定し系統樹解析に用いた。【結果と考察】流入下水から35種類1386株のウイルスが分離された。EV(23血清型)が674株、レオウイルス2型が485株、アデノウイルス(Ad)(11血清型)が227株であった。エンテロウイルスC群(EV-C)のポリオウイルス(PV)は2012年9月よりOPV(経口生ワクチン)からIPV(不活化ワクチン)に切替わり、それを反映して、下水からは同年7月を最後に検出されなかった。患者から多く検出されるEV-A(コクサッキーウイルスA2型(CV-A2), CV-A16, EV-71)は下水からは少なかった。一方、EV-B(CV-B群, エコーウイルス)は患者と下水の両方から同じ時期に検出された。CV-B群系統樹解析を行った結果、血清型により採取年毎にクラスター形成がみられた。Ad-C亜属(Ad-1, 2, 5, 6)、A亜属(Ad-31)、E亜属(Ad-4)は患者と下水の両方から検出されたが、B1亜属(Ad-3)、F亜属(Ad-41)は患者からは検出されたが、下水からは少なかった。分離培養法では下水から検出されにくいウイルスがあり、環境中でのウイルス量や粒子の安定性等が影響すると考えられた。下水調査により、小児患者主体の感染症発生動向調査では把握の難しい成人間での流行や不顕性感染症の把握が可能となると考えられた。

伊藤 寿宏¹, 北島 正章², 加藤 毅³, 石井 聡⁴, 瀬川 高弘⁵, 岡部 聡², 佐野 大輔⁶¹京都大・院医学, ²北大・院工学, ³群馬大・院理工学, ⁴ミネソタ大・BioTechnology Institute, ⁵山梨大・総合分析実験センター, ⁶東北大・院工学

世界各地で淡水資源の不足が深刻化してきた昨今、下水再生水は代替水資源の一つとして利用が進められている。下水中には高濃度の病原微生物（原虫・細菌・ウイルス）が含まれることから、再生利用の際には病原微生物を十分に除去・不活化することが不可欠である。下水再生水の利用に関するWHOのガイドラインでは、下水再生水の用途に応じ下水処理プロセスで達成されるべき病原微生物の目標除去効率が対数表記されており、下水処理プロセスはその目標除去効率を達成するように設計される。しかしながら、下水処理プロセスの目標除去効率の算定法は、国際的なガイドラインなどに明記されておらず、衛生微生物学的に安心・安全な下水再生水を提供するためには、科学的根拠に基づいた計算方法が確立される必要がある。本研究では、我が国における重要な水系感染症原因微生物であるノロウイルスgenogroup II（NoV GII）に焦点を当て、NoV GIIの疫学的情報に基づいて目標除去効率を算出するための枠組みを確立することを目的とした。始めに、国内下水処理場の未処理下水から得られたNoV GII濃度の定量値を用いて、未処理下水中NoV GII濃度分布を推定した。次いで、下水再生水を用いて栽培した生食野菜を消費者が喫食するときにNoV GIIの経口曝露が生じると仮定し、WHOが推奨する定量的微生物リスク評価（QMRA）及び許容リスク（ 10^{-6} DALYpppy）をもとに、下水再生水中NoV GII濃度に基準値を設定した。最後に、下水処理後のNoV GII濃度が設定した基準値を下回る確率（信頼度: 95～99.9%）を定義し、NoV GIIの未処理下水中濃度及び基準値から下水処理プロセスにおけるNoV GIIの目標除去効率を算出した。消費者の生食野菜喫食により経口曝露が生じるシナリオでは、NoV GII目標除去効率が $2.1 \sim 4.6 \log_{10}$ として算出され、上述した95～99.9%の信頼度の間で生じる目標除去効率の差は約 $2.5 \log_{10}$ であった。既報の研究では、マウスノロウイルスの不活化効率を $1 \log_{10}$ 上昇させる場合、必要とされる塩素消毒強度が約25倍上昇するとされている。このことから、NoV GII目標除去効率の約 $2.5 \log_{10}$ の差が下水処理プロセスの運転条件やコストに影響を与えることは明らかであり、QMRAを用いて目標除去効率を算出する場合には、再生利用を実施する地域で求められる条件（許容リスク、コストなど）を考慮して計算に用いるパラメータを設定する必要がある。

加藤 蒼, 福島 淳, 志村 洋一郎
秋田県立大・生物資源科学

【背景・目的】 1970～2000年代にかけて細菌性食中毒の主は腸炎ビブリオおよびサルモネラ食中毒であったが、衛生対策が進みその事件数は減少している。現在、カンピロバクターが細菌性食中毒の主となり、年間200件以上の事件が発生している。衛生指導は実施されているが事件数の低下は見られず、対策は停滞している。ヒトの腸炎起因菌として *Campylobacter jejuni* と *C. coli* が知られ、感染の主な原因としては、鶏肉を中心とした肉類の生食等が挙げられる。国内のプロイラー鶏群の保菌率は47%、ブタでは *C. coli* が42%、ウシでは *C. jejuni* が36 %そして *C. coli* が4%の保菌率と報告されている (Haruna M. et al. 2012 ; Haruna M. et al. 2013) 。そのため、カンピロバクター食中毒の予防には家畜の保菌率の減少が第一段階の衛生対策となる。そこで、本研究はカンピロバクター増殖抑制効果を持つ細菌をスクリーニングし、その増殖抑制効果のメカニズムを明らかにすることを最終目的とし、本実験ではカンピロバクター生育抑制を指標としウシルーメン液および研究室保存株からカンピロバクター生育抑制菌株の探索を行なった。【方法】 ウシルーメン液または乳酸菌研究室保存株から、カンピロバクター生育抑制活性株の探索を行った。実験1と2ではウシルーメン液を、実験3では乳酸菌研究室保存株をサンプルとして用いた。また、選抜した菌株29株について、大腸菌やブドウ球菌など6株に対する生育抑制をペーパーディスク法で評価した。【結果・考察】 3回の実験から、*C. jejuni*あるいは *C. coli* 生育抑制活性を示す株を32株選抜した。実験1で選抜した株について16S rRNA遺伝子の塩基配列解析を行い、7株が *Bacillus* 属菌と4株が *Paenibacillus* 属菌と同定された。実験1と2で得た株の培養液のpHは全て7.0であったことから、酸産生による生育抑制ではなく他の要因であると推測された。実験3において、乳酸菌研究室保存株20株のうちに *C. jejuni* の生育抑制活性を示す株を2株見出した。この2株の培養液のpHは4.0であり、産生された酸が生育抑制に効果を示したものと推測された。食中毒菌6株への生育抑制試験の結果、複数の分離菌株が黄色ブドウ球菌に対して生育阻害活性を示した。

渡辺 康太¹, 西 英二², 田代 幸寛¹, 酒井 謙二¹¹九大院・生資環, ²大分科捜研

[背景・目的]人体には多くの種類の細菌が存在し、部位により多様な細菌群集構造を形成している。我々は先行研究で、その構造が個々人で特異的であり、T-RFLP法による解析にて、異同識別が可能であることを報告した（Nishi et al. Legal Med, 25, 75-82, 2017）。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析により、頭頂部より採取した毛髪の全毛幹試料において、種レベルでも個々人に特有の細菌群集構造を形成することが分かった（渡辺ら、第23回日本生物工学会九州支部飯塚大会）。本研究では、同一被験者内における異なる採取点および部位での毛髪細菌群集構造の相違について明らかにすることを目的とした。[実験方法]被験者1名に対して1本の毛髪中の部位（先端部、中間部、基底部）の違い、及び採取点（前髪、頭頂部、後髪、右側頭部、左側頭部）の違いについて検討した。さらに、同一被験者の毛髪を6月～8月の3ヶ月間に渡り毎月採取し、細菌群集構造の変遷を調査した。採取した毛髪から細菌DNAを抽出した後、qPCR法にて細菌の部分16S rRNA遺伝子のコピー数を定量することにより、毛髪1 cm当たりの細菌数を求めた。さらに、MiSeqによる16Sアンプリコン解析を行い、得られたシーケンスデータはUSEARCH, QIIMEを用いて多様性解析を行った。[結果・考察]qPCRの結果、全ての毛髪試料に1 cmあたり平均 $5.4(\pm 3.3) \times 10^4$ copiesの細菌が存在することが明らかとなった。 α 多様性解析の結果、同月での採取点、部位の違いによる有意差はなかったが、6月から7月にかけてどの採取点・部位でも減少し、その後一定した。有占門はProteobacteria門、Actinobacteria門、Firmicutes門の順に構成されており、属レベルでは*Pseudomonas*属、*Cutibacterium*属が多くを占めていた。次に、主座標分析法にて β 多様性を比較した結果、経月変化によらず同一被験者内でクラスターが形成され、 α 多様性の変化は非有占属の変化であることが分かった。以上の結果から、個人内のヒト毛髪に付着する細菌群集構造は採取点および部位の違いに影響を受けず、有占属は常在的に安定して存在することが示唆された。

青木 純理¹, 川端 彩加¹, 那須 正夫², 一條 知昭³¹大阪大・薬, ²大阪大谷大・薬, ³大阪大・院薬

【目的】宇宙環境において微生物は、微小重力や宇宙放射線の影響を受けることとなる。細菌間遺伝子伝播は細菌が新たな環境に適応するための重要な戦略であり、耐性遺伝子をはじめとする遺伝子が細菌間で伝播し、細菌にとって生存に有利に働く遺伝子が定着する。地上とは異なる細菌の適応機構が働くことも考えられることから、宇宙環境が細菌の環境適応に及ぼす影響を明らかにすることは、宇宙居住環境における細菌による潜在的リスクを考察するうえで重要である。そこで本研究では微小重力に着目し、微小重力が細菌間遺伝子水平伝播に与える影響について接合、および形質転換に着目し検討した。

【方法】接合：大腸菌K12（プラスミドRK2::gfpを保有）と非病原性大腸菌O157を混合し37℃で通常重力下と擬似微小重力下において反応させ、接合頻度を比較した。接合伝達体数はカナマイシンをマーカーとする選択培養法で測定した。形質転換：Acinetobacter baylyi ADP1と、pBAV1k-T5-gfpを混合し、擬似微小重力環境と通常重力環境において室温で反応させ、形質転換頻度を比較した。形質転換体数はGFP発現体の直接計数、カナマイシンをマーカーとする選択培養法で測定した。なお、本研究では3Dクリノスタットを用いて微小重力環境を模擬した。

【結果と考察】接合頻度を比較したところ、通常重力下と擬似微小重力下はそれぞれ 10^{-1} ～ 10^{-2} と大きな差は見られなかった。また、形質転換においては、GFP発現を指標とした場合には、2つ系に差は見られなかった一方、選択培養法で求めた頻度では、擬似微小重力下の方が、形質転換頻度が約1オーダー下回った。すなわち、微小重力下での細菌間遺伝子水平伝播頻度は地上と比較して同程度、もしくは低くなると考えられた。

*本研究はMEXT科研費・新学術領域研究（15H05946）の助成により実施した。

小森園 亮¹, 佐々 悠木子², 堀江 真行¹, 牧野 晶子¹, 朝長 啓造¹¹京大・ウイルス再生研, ²東京農工大・農

ボルナウイルスは、核内での持続感染を特徴とするRNAウイルスである。現在ボルナウイルス科ボルナウイルス属には哺乳類、鳥類ならびに爬虫類での感染が確認されている遺伝子型の異なる20のウイルス種が同定されている。これまでの研究から、いくつかの鳥類由来ボルナウイルスでは哺乳類細胞への感染が確認されており、人獣共通感染症としての潜在性が示唆されている。しかしながら鳥ボルナウイルスの宿主域を規定する分子基盤は明らかではない。そこで本研究では鳥ボルナウイルスの人獣共通感染症としての危険性評価を目的に、ボルナウイルスの感染宿主域に関与する分子機構の解明を行った。系統樹解析により、ボルナウイルス科のウイルスは3つのClade（1:哺乳類由来ウイルス、2および3:鳥類由来ウイルス）に分類されることが示された。培養細胞を用いて各ウイルスの感染性を評価したところ、Clade 3の鳥ボルナウイルスは鳥類細胞にのみ感染するのに対して、Clade 2の鳥ボルナウイルスは哺乳類細胞にも感染性を示すことが明らかとなった。そこで細胞への吸着に重要なウイルスの表面糖タンパク質の組換えにより各Cladeのウイルスの感染性ならびに合胞体形成能を評価したところ、Clade 2のウイルスだけでなく、Clade 3に属するウイルスの表面糖タンパク質も哺乳類細胞への吸着能力を有することが示された。次に細胞内でのウイルス転写を模倣するミニゲノムアッセイにより、各Cladeのウイルスの転写活性を哺乳類細胞と鳥類細胞で評価した。その結果、Clade 3の鳥ボルナウイルスは哺乳類細胞での転写活性が顕著に抑制されていることが示され、Clade 3の鳥ボルナウイルスの宿主域は細胞内での複製過程に規定されていることが示唆された。そこで次にウイルスの核移行に重要なウイルスのヌクレオプロテイン（N）の核移行シグナル（NLS）に着目し、NLSをClade 1のものと置換したClade 3鳥ボルナウイルスのNを作製した。その結果、置換したClade3のNは哺乳類細胞での転写活性を上昇させることが示された。さらにNのNLSには正の自然淘汰による変異の蓄積が起こっていることが示され、進化上ボルナウイルスの宿主域決定にNの核移行が重要な役割を果たしたことが示唆された。本研究により、鳥ボルナウイルスの人獣共通感染症としての危険性が示された。また、ボルナウイルスは核移行および核内での転写・複製段階で宿主域が規定されることが明らかとなった。

河合 祐人¹, 山本 尚輝¹, 凌 一葦², 奥田 修二郎², 松本 慎也³, 常田 聡¹¹早大・先進理工・生命医科, ²新潟大院・医歯・バイオインフォマティクス, ³名大・医・細菌学

【目的】生態系・種・遺伝子の多様性が生物の生存に重要であることは広く知られているが、遺伝子が同一の集団の中にもさらに表現型の多様性が存在することが明らかとなってきた。表現型の多様性はクローンの生存に貢献しており、実際に医学分野では抗生物質投与などの致死的な環境変化に対しても生存し続ける表現型persisterの存在が問題となっている。生存には多様なメカニズムが関わっているため未解明な部分が多いが、分裂を停止することが重要な要素だと考えられている。また、生存した細菌は突然増殖を再開することから、細菌は増殖・生存という2つの表現型をスイッチしていると考えられる。我々はこれまでに乳酸発酵酵素ldhAの発現がpersister形成に関わっていることを報告した。しかしldhAのノックダウンによるpersister形成の抑制効果は培養環境に依存することが示唆された。そこで本研究では培養環境の変化がpersister形成メカニズムに与える影響を調べることを目的とした。【方法】バイオフィーム形成などで生じると考えられるストレス環境（炭素源枯渇、嫌気、酸性ストレス）で大腸菌を培養した。各環境からpersisterを分取し、RNA-sequencingによって遺伝子発現を網羅的に解析した。解析結果からいずれの環境でも高発現した遺伝子をノックダウンさせた株を構築し、抗生物質処理後のCFUを用いてpersister数の変化を測定した。【結果】遺伝子発現は環境毎に異なり、特に嫌気環境の表現型は他の環境と大きく異なっていた。一方で38の遺伝子は各環境のpersisterで共通して発現していた。このうちの8遺伝子は窒素飢餓に応答する転写因子NtrCによって制御され、persisterは窒素枯渇状態であることが示唆された。その他には活性酸素に対する防御や、定常期依存的に発現するストレス応答遺伝子が発現していた。これらの遺伝子の中から、アルデヒドを酢酸に代謝するaldBをノックダウンしたところ、富栄養なLB培地培養条件でpersisterの減少が見られた。aldBは複数のストレス環境でも高発現していたことから、どの環境でもpersisterを減少させる効果が期待されたが、アミノ酸が無くグルコースのみの最少培地では逆にpersisterが増加した。培養環境がメカニズムに強く影響していることが示唆されたため、今後はpersisterの形成メカニズムについて細菌の情報だけではなく、周囲の環境との相互作用をさらに調べる必要があると考えられる。

南宮 湖^{1,2}, 倉島 篤行³, 森本 耕三³, 星野 仁彦⁴, 長谷川 直樹⁵, 阿戸 学⁴, 御手洗 聡⁶

¹慶應義塾大学医学部呼吸器内科, ²永寿総合病院呼吸器内科, ³結核予防会複十字病院, ⁴国立感染症研究所, ⁵慶應義塾大学医学部
感染制御センター, ⁶結核予防会結核研究所

【背景】近年、本邦における肺非結核性抗酸菌（NTM）症の増加が指摘されている。肺NTM症に関する過去の全国調査は、結核との罹患率を比較する方法で、国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班による調査や非結核性抗酸菌症研究協議会による全国調査が実施されてきた。しかし、肺NTM症の推定患率が5.7人/10万人と算出された2007年の全国調査を最後に、近年の肺NTM症の疫学的実態は不明であった。

【方法】日本呼吸器学会認定施設・関連施設(873施設)に、2014年1月から3月までの肺NTM症と結核の新規診断数を記入するアンケート調査を実施した。また、主要な検査センターにおける2012 -2013年の全抗酸菌分離データを分析した。

【結果】日本呼吸器学会認定施設・関連施設を対象にした全国調査の結果、肺NTM症の推定罹患率は14.7人/10万人と算出され、2007年の全国調査と比較して、約2.6倍に増加した。肺MAC症が88.8%と大多数を占め、その内訳は、東日本では*M. avium*が約3/4を占めるのに対し、西日本では*M. avium*と*M. intracellulare*がほぼ同率であった。主要な検査センターの菌株情報をういた全国調査においても、上記と同様の菌種の地域分布が確認された。また、肺*M. kansasii*症の推定罹患率は0.6人/10万人、肺*M. abscessus*症の推定罹患率は0.5人/10万人と算出され、肺*M. kansasii*症は近畿地方に多く、肺*M. abscessus*症は九州・沖縄地方に多いことが明らかになった。

【結語】肺NTM症の推定罹患率は14.7人/10万人と算出され、近年、増加していることが明らかになった。肺NTM症は地域により原因菌種が大きく異なり、環境要因の関与が示唆された。

安達 桂香¹, Singh Pal Ravindra¹, 大谷 郁², 園元 謙二¹, 中山 二郎¹¹九大院・農, ²ミヤリサン製菓

（背景）環境中に存在する様々な病原菌は、クオラムセンシング（QS）という菌密度依存的シグナルコミュニケーションにより複数の毒素を産生し、食中毒やガス壊疽といった重篤な病気を引き起こす。例えば、食中毒やガス壊疽の原因菌 *Clostridium perfringens* は、自己誘導性ペプチド（autoinducing peptide, AIP）を QS シグナルとして、VirSR 二成分制御系（VirSR TCS）を介した *agr* 様 QS により複数の毒素遺伝子を発現する。ところが溶血性毒素遺伝子 *pfoA* の発現は対数増殖期中期以降著しく低下し、本菌は自身の QS 機構を自ら抑制する内在性クオラムクエンチング（self-quorum sensing : sQQ）機構を有していることが示唆された。本菌の sQQ 誘導期馴化培養液について諸性質解析を行った結果、培養液中に含まれる sQQ 誘導因子は極性の低い低分子酸性化合物であることが推定され、酸性代謝物の蓄積による培養 pH の低下によって誘導されることが判明した。本研究では、*C. perfringens* の sQQ の作用機序の解析および sQQ により発現制御される遺伝子の解析を行った。（方法・結果）*C. perfringens* strain 13 を 0~6 時間嫌気培養し、逆転写定量 PCR（RT-qPCR）により各培養時間における溶血性毒素遺伝子 *pfoA* の転写量の増減を解析することで QS-QQ シフトをモニタリングした。同時に、馴化培養液を LC-MS/MS とガスクロマトグラフィーに供して AIP 生産量および有機酸生産量を測定した。その結果、sQQ 活性は有機酸の蓄積による培養 pH の低下によって誘導されることが示唆された。sQQ 誘導期馴化培養液を QS 誘導期の菌体に添加すると、約 10 分で *pfoA* がほぼ完全に消失した。同様の現象は、RNA 合成阻害剤であるリファンピシンを加えることでも確認され、sQQ は新生 RNA 合成阻害によるものであることが示唆された。また、本菌の sQQ は、AIP 存在下でも同様にみられることから、sQQ は AIP による QS の誘導を阻害しているようである。更に、sQQ 誘導期馴化培養液の添加時と無添加時の VirSR TCS 制御下遺伝子の発現変動を RT-qPCR により解析した。その結果、VirSR TCS に直接的な制御を受けている遺伝子が sQQ の作用を受ける傾向があることが判明した。現在、sQQ の分子機構について解析を進行中であり、実環境中における QS-sQQ ネットワークの解明に繋がることが期待される。

井上 紗智¹, 稲葉 知大², 尾花 望³, 泉福 英信⁴, 野村 暢彦³¹筑波大・院生命環境, ²産総研・環境管理, ³筑波大・生命環境, ⁴感染研・細菌 1

人の口腔内には約700種の細菌が存在し、非常に複雑な生態系を成している。これらの細菌の多くは、歯表面にバイオフィルムと呼ばれる細胞外マトリクスに覆われた細菌の集合体を形成する。このバイオフィルムは、単一種のみで構成されるのではなく、複数種の細菌を含んだ構造であり、細菌の成長と定着に重要な機構である。う蝕と歯周病は口腔の二大疾患であり、両者ともバイオフィルムによる感染症として知られる。う蝕は、*Streptococcus mutans*のバイオフィルム形成に伴う歯表面の有機酸の局所的な蓄積が原因とされる。*S. mutans*はCSP、XIPという二つのペプチドシグナルを用いたクオラムセンシングを行い、自身のバイオフィルム形成を制御することが明らかとなっている。一方、口腔内に存在するいくつかの細菌はインドールを産生する。インドールは多くの細菌においてバイオフィルム形成に関与する因子であることが報告されている。そこで、本研究では口腔細菌が産出するインドールの*S. mutans*のバイオフィルム形成へ与える影響を解析した。*S. mutans*をインドール存在下で培養した結果、非存在下と比較してバイオフィルム形成量が増加した。さらに、*S. mutans*のXIPエフェクター遺伝子である*comX*の欠損株を用いた試験を行うと、インドールを添加してもバイオフィルム形成量は変化しなかった。このことより、インドールがXIPクオラムセンシング経路を介し、*S. mutans*のバイオフィルム形成に関与する可能性が示唆された。また、インドールを生産する歯周病原性細菌の一種として知られる*Fusobacterium nucleatum*と*S. mutans*の共培養を行った。その結果、単独での培養に比べ、共培養時はバイオフィルム形成量の増加がみられた。以上の結果より、インドールは*S. mutans*のバイオフィルム形成を促進することが明らかとなった。また、口腔内においてインドール生産菌と*S. mutans*の細胞間相互作用によって複合系バイオフィルムの形成が促進されている可能性が考えられた。

*Filobacterium rodentium*は、以前CARバチルス(Cilia-associated respiratory bacillus)と呼ばれていたフィラメント状グラム陰性桿菌で、バクテロイデス門スフィンゴバクテリウム目の新科 フィロバクテリウム科(*Filobacteriaceae*)に属する新属・新種である*。この菌はマウス・ラットの呼吸器線毛上皮細胞に主に感染し慢性呼吸器疾患を起こす。マウス・ラット以外にもウサギ、ブタ、ウシなどで本菌に類似した菌が報告され、それらの16S rRNA遺伝子配列と*F. rodentium*のそれとのホモロジー解析から同属別種の可能性が高い(学名未定)。スフィンゴバクテリウム目の他の*F. rodentium*近縁菌種はすべて水辺環境に見られる非病原性の細菌群であり、近縁菌の中では*F. rodentium*(および類似菌)だけが哺乳動物に病原性を示す。*F. rodentium*は培養が困難とされてきたが、我々はVero E6細胞の培養上清を用いて本菌ラット分離SMR-C株の効率よい液体培養に成功し、*F. rodentium*の完全ゲノム配列を世界ではじめて決定した(全長1,439,084 bp、環状)。ゲノム解析から約1,200のコード領域が推定され、その3分の1は機能未知で、病原因子を始めとする多くの情報はいまだ不明である。その中で、*F. rodentium*が滑走運動するとの報告を基にゲノム解析を進めると、コード領域に滑走運動関連遺伝子を確認することができた。我々は*F. rodentium*の培養観察から、培養細胞用に親水処理したプラスチック面に本菌が付着してネット状構造面を作ること、一方、付着低減処理した培養器では浮遊状態で増殖しバイオフィーム層を形成すること、メチルセルロースを添加して滑走運動を抑制すると結核菌コード構造に似た増殖休止とみられる形態を取るなど、環境によって群構造を変化させることを発見した。群構造変化時に本菌は活発な滑走運動を示す。本菌の滑走運動関連遺伝子は、最近提唱された9型分泌装置(T9SS)とのホモロジーも高く、滑走運動関連分子は本菌の病原性と関係しているかもしれない。本発表では、*F. rodentium*の最近の研究成果を示し、参加者と意見交換したい。*: Ike, F. *et al.* 2016. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 150–157.[本研究は、文科省科研費、(財)森永奉仕会、(財)旗影会などの支援を受けた]

伊澤 徹¹, 豊福 雅典², 清川 達則¹, 楊 佳約¹, 尾花 望², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境系

実環境中において、多くの微生物はバイオフィームと呼ばれる集団構造体を形成する。バイオフィームとは、微生物集団が細胞外高分子物質によって覆われた三次元構造体である。バイオフィームは栄養や酸素分圧の勾配、代謝産物の蓄積等、不均一な環境であることが知られている。このような環境はバイオフィームを構成する微生物に対してストレスであり、自然突然変異株の出現を誘導すると予想されている。実際にバイオフィームにおいて自然突然変異株出現頻度の飛躍的な増加が報告されている。バイオフィーム中に出現する自然突然変異株は様々な表現型を有していることから、バイオフィームの環境適応機構の一つであることが予想される。しかしながら、自然突然変異株の出現頻度の増加とバイオフィーム構造体の関係についてその詳細は明らかにされていない。本研究では、バイオフィームのモデル細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1株を用いて、バイオフィーム三次元構造体における自然突然変異株の局在を時空間的に解析することにより、バイオフィーム構造体における自然突然変異株出現機構の解明を目指すこととした。recA遺伝子はバイオフィームにおける自然突然変異株の出現に強く関与することが知られている。バイオフィーム中のrecA発現の局在と自然突然変異株出現との関係性を解析するためにrecAプロモーターレポーター株 (PrecA-egfp) を作製した。本レポーター株を用いてフローセル中でバイオフィーム形成させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィーム構造体およびrecAプロモーター活性を観察した。結果、バイオフィーム集団中の一部細胞のみ強いrecAプロモーター活性を示した。さらに興味深いことに、recAプロモーター活性を示す細胞はバイオフィーム底面部に局在している様子が観察された。これはバイオフィーム内部の不均一な環境との関係性が予想される。現在はバイオフィーム形成に伴ったrecAプロモーター活性の動態を観察することによって、recA発現とバイオフィーム環境との関連性について解析を進めている。

高野 恵, 大桃 惇也, 志村 洋一郎, 福島 淳
秋田県立大学生物資源科学部微生物学研究室

【背景・目的】

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は好気性グラム陰性桿菌であり、土壌、淡水、海水中など自然界に広く存在している。緑膿菌を含むグラム陰性菌は膜小胞 (Membrane Vesicle : MV) と呼ばれる粒子を産生することが知られている。MVは直径50~220 nm の二重膜の球状の粒子であり、リポ多糖、外膜タンパク質、リン脂質などから構成されている。MVには外膜小胞 (Outer Membrane Vesicle : OMV) と内膜-外膜小胞 (Inner-Outer MV : I-OMV) の二種類あることが報告された [1]。I-OMVは細胞が自己溶菌する際に生成し、DNAを含んでいることも示唆されている。そこで、本研究ではI-OMVの産生について着目し、ペプチドグリカン (PG) を分解する酵素AmpB [2] のMV産生への関与について調べることを目的とした。

【方法】

大腸菌でampB遺伝子のT7プロモーターを使った発現系を作製した [2]。次に緑膿菌で二重交差法により、PG分解酵素遺伝子の破壊株を作製した。ここで得た大腸菌と緑膿菌でMV産生量、MVに含まれるDNA量について調べた。MV産生量はそれぞれの菌の培養上清を超速心で分画してMV画分を分離し、OD₂₂₀で定量した。含有DNA量は同じ画分についてSYBR Green Iにより定量した。また、菌体の形状、表面を電子顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

シグナルペプチドを持つPG分解酵素遺伝子の発現プラスミドを含む大腸菌ではIPTG添加後にOD₆₀₀の値が下がり、菌が破裂した像が見られた。

緑膿菌のPG分解酵素遺伝子の破壊実験をして得た株と野生株との超速心沈殿画分 (MVを含む) のOD₂₂₀の値は、野生株が破壊実験株の4.1倍の値となった。さらに、DNA量を測定したところ、野生株の単位OD₂₂₀当たりのDNA量は破壊株の5.39倍になっていた。このことからPG分解酵素遺伝子の破壊実験を行ったことにより、DNAを含むMVの産生量が減少すると考えられた。以上よりPG分解酵素は大腸菌と緑膿菌で溶菌を引き起こし、I-OMVの産生に関与している可能性があると考えられる。

[1] C. Perez-cruz et al. (2015) PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.01168 [2] E. M. Scheurwater et al. (2007) Protein Expression and Purification 56: 128-137

長谷川 琢也¹, 井樋 千絵², 岡部 淳², 加藤 雄亮², 川出 洋¹, 夏目 雅裕¹¹東農工大・連農, ²東農工大・院農

【目的】植物の根からは様々な物質が分泌されており、他の植物や土壌微生物との相互作用に関与している。青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、宿主であるトマトの根滲出物に対して走化性を示し、その応答は非宿主であるイネの根滲出物に対してよりも強いこと、運動能を欠損した変異株の病原性は親株よりも弱いことが報告されている。一方植物は、青枯病菌のような病原菌と戦うためにヒドロキシケイ皮酸類（HCA）を防御物質として生産・分泌している。近年、青枯病菌のHCA分解能力が多様な系統において遺伝的、機能的に保存されていること、HCAを分解できない変異株はトマトに対する病原性が低下すること、が報告された。我々はトマトの根滲出物に含まれる宿主特異的な走化性誘引物質を、活性を指標に探索している。本報ではトマトが生産している様々な二次代謝産物（HCAを含む芳香族カルボン酸やフラボノイドなど）が青枯病菌の宿主植物への感染時に走化性誘引物質・忌避物質として働いている可能性を考えて、それらの走化性活性を調べた。【方法】トマトによる生産が報告されている約20種類の芳香族カルボン酸やフラボノイドなどの走化性誘引・忌避活性を軟寒天培地法で評価した。すなわち、シャーレの両端に試料を含むペーパーディスクと空のペーパーディスク（ブランク）を置き、中央に青枯病菌液をスポットして、28℃で1週間培養後、青枯病菌の試料側とブランク側への移動距離を測定し、その差を走化性活性とした。【結果および考察】 芳香族カルボン酸のうち、4- ヒドロキシ安息香酸と4- ヒドロキシケイ皮酸が強い走化性誘引活性を示した。一方、2- or 3- ヒドロキシケイ皮酸や安息香酸、フェルラ酸、カフェ酸は誘引活性を示さなかった。これらの結果から1) フェノール性化合物の4位の水酸基・カルボキシル基の存在が走化性誘引活性を示すために重要であること、2) 3位の水酸基・メトキシ基は誘引活性を失活させることが示唆された。今後、芳香族カルボン酸の走化性誘引活性の構造活性相関について更に詳細な検討を行う予定である。

平木 裕磨¹, 松原 陽一², 生澤 俊朗³¹岐阜大・院・自然科学技術, ²岐阜大・応用生物, ³(株)朝日生薬

薬用ニンジン (*Panax ginseng* C.A. Meyer)では、主要輸入国である中国産における残留農薬問題等に伴い、日本国内での安定供給・安全性の確保が求められている。しかし、薬用ニンジンは低吸肥性で生育が緩やかであることから、収穫までに5, 6年を要する。また、病害やアレロパシーに起因する忌地現象・改植障害が問題となっている。本研究では、国内薬用ニンジンにおける忌地現象発生機構解明の一環として、忌地症状の組織学的観察、PCR-SSCP (single-stranded conformational polymorphism)解析法による発病誘導菌種同定法の確立、菌根菌 (アーバスキュラー菌根菌)をエージェントとした植物生育改善法の検討を行った。組織学的観察の結果、忌地症状株の主根部では、外観症状として主に根腐れが観察され、表皮、皮層外層・内層における菌糸の存在により、病害起因であることが示唆された。また、数種病原菌株については、PCR-SSCP解析による識別が可能であった。続いて、薬用ニンジン1年生苗において、菌根菌定着・植物体生育促進効果は慣行栽培法で大きく発現し、品質指標となる、根長・根茎の増加が起因した。これらのことから、薬用ニンジン忌地症状では病害が主因であり、分離病原菌同定にはPCR-SSCP法が有効で、多量のサンプルを迅速に同定解析可能と考えられた。また、薬用ニンジンと菌根菌との高親和性が確認され、菌根菌共生による植物体生育促進効果により、育苗期間短縮・高品質苗養成・耐病性誘導による忌地症状軽減等を図れる可能性があると考えられた。

倉岡 卓也, 石山 明人, 緒方 裕季恵, 松尾 優香, 小山田 浩子, 小川 由起子, 小林 秀光
長崎国際大・薬

放線菌*Actinomadura sporax*の培養液から得られるBenanomicin A（以下、BnmAと省略）は、ベンゾ[a]ナフタセキノン核をもつ分子量864の抗真菌活性を示す抗生物質である。この化合物は抗菌活性のみならず、 Ca^{2+} の存在下でマンノースを含む高分子多糖と複合体を形成して沈殿させる性質（レクチン様活性）を持つことで知られている。

病原性*Candida*酵母の免疫化学的研究において、最も重要なポイントの一つは、抗原となる細胞壁マンナンタンパク（以下、マンナンと省略）を無傷な状態で分離することである。マンナン調製法としてFehling法がよく知られているが、この操作途中には強アルカリ性となる過程が存在するため、アルカリ不安定糖鎖を持つマンナンを調製する場合、最適の方法とは言い難い。今回は、BnmAのレクチン様機能を利用することで、簡便かつ迅速に*Candida krusei*の細胞壁マンナンを単離精製し、そのアルカリ不安定糖鎖について、Fehling法で調製したものと比較検討した。

【材料と方法】*C. krusei* NBRC 0584株を酵母エキス加サブロー液体培地で培養し、熱水抽出法で粗抽出物を得た。次いで、従来法であるFehling法とBnmAを用いた新規法（以下、BnmA法と省略）により、粗抽出物からマンナンを各々単離精製した。マンナンの化学構造は、 ^1H -NMR分析、希アルカリ処理法により検討した。

【結果と考察】従来のFehling法で調製したマンナンの収率は、粗抽出物に対して30.1%であったのに対して、BnmA法で精製したマンナンでは54.7%となり、大幅な収量の増加が認められた。2つのマンナンを ^1H -NMR分析で比較した結果、いずれのパターンにも、 α -1,2、 α -1,3、 α -1,6結合マンノース残基に基づく4本の主要シグナルが認められ、両マンナンはほぼ同一構造であることが判った。次いで、2つのマンナンから希アルカリ処理で遊離するオリゴ糖（4糖、3糖及び2糖）の収率を求めたところ、Fehling法で5.4(w/w)%, BnmA法で20.0(w/w)%と大きく異なった。また、生成オリゴ糖の ^1H -NMR分析の結果、これらのオリゴ糖は、いずれも α -1,2結合から成る同一構造のものであった。

以上より、BnmA法はFehling法と比較して緩和でより優れた方法であり、アルカリに不安定な糖鎖をほぼ無傷で残存させると考えられる。また、操作方法は簡便かつ再現性にも優れ、安定な結果を与えることも明らかになった。

オズミンスキー 真理¹, 西山 恭子¹, 箕浦 潔², 山田 美穂², 溝口 貴士², 金子 俊博², 腰塚 哲朗¹, 和田 郁夫³, 錫谷 達夫¹

¹福島県立医科大学微生物学講座, ²SHARP株式会社, ³福島県立医科大学細胞科学研究部門

目的モスアイフィルムはナノレベルの突起構造が並んだ造りをしており、光の反射を減弱させる効果があるため、SHARP株式会社ではテレビ画面に張り、鮮明な画質を提供している。2013年11月26日に、nature communications誌で、豪スインバーン工科大学・イワノワ教授がナノ構造に抗菌効果があるという論文を発表した。これを受けてSHARP社製モスアイフィルムに抗菌効果があるか検証することとした。方法最初の実験はEscherichia coli (NBRC3972)を使用しJIS Z 2801の規格に従い試験菌液をフィルムの表面が完全に覆われるように乗せた状態で、フィルムが抗菌効果を発揮するか検証した。2つ目の実験ではStaphylococcus aureus (NBRC12732)を使用し、液体が拡散しやすく速乾性に優れたモスアイフィルムの特性を生かし、微量の菌液を点状にフィルムに乗せ、抗菌効果を検証した。3つ目の実験として電子顕微鏡を用いてフィルム上の菌の形態観察を行った。結果菌液に完全に覆われた状態では同じアクリル樹脂で作成したナノ構造を持たない平らなフィルムとナノ構造を持つモスアイフィルムの両方に同等の抗菌効果が見られた。微量の液体を用いた検証では、モスアイフィルムはナノ構造を持たない平らなフィルムに比べて半分の時間で菌の生存率を低下させた。電子顕微鏡によるフィルム上の菌の形態観察では、ナノ構造のない平らなフィルム上でS.aureusは大きな集塊を形成していたがモスアイフィルム上では大きな集塊は形成されておらず、菌は散在していた。考察検証からモスアイフィルムの抗菌効果は微量の液体で発揮することが分かった。抗菌作用はナノ構造とアクリル樹脂の成分の両方の存在が必要である事が分かった。形態観察よりその機序として菌の集塊形成を阻止する事が一因であると考えられた。今後はどのような種類の細菌や真菌に対して抗菌効果を発揮するか検討する必要がある。モスアイフィルムは将来、医療や食品管理などの場での使用が期待される。

小野 義隆

ブレインツリー・バイオテクノロジー研究所

石垣島と西表島においてクロヨナ (*Pongamina pinnata*) に寄生する *Ravenelia hobsonii* とシノキカズラ (*Derris trifoliata*) に寄生する *Hapalophragmium derridis* の精子・さび孢子世代が見出され、それぞれの同種寄生性・長世代型生活環が確認された。両菌は常緑樹の宿主上で夏孢子世代だけで永存できるが、石垣島と西表島においては夏孢子的繰り返し感染に加えて、有性生殖を含めて規則的に全生活環を経過できることが明らかになった。*Ravenelia hobsonii* が角皮下生の精子器と Uredo 型さび孢子堆を形成し同種寄生性・長世代型生活環をもつことは 1969 年にインドで報告された。しかし、それ以降、本菌の精子・さび孢子世代の報告はなかった。本菌の精子器・さび孢子堆はやや肥厚した円形-不整形の病斑両面に密生していた。精子器は角皮下生で円錐形-台形であった。さび孢子堆は表皮下生で、さび孢子は短柄上に単生し、倒卵形-洋梨型であった。孢子壁は棘で覆われ、孢子の頂部近くに1個の発芽孔が認められた。夏孢子堆は葉の背軸面に群生-散生し、夏孢子的形態はさび孢子と同様であった。冬孢子堆は葉の背軸面に群生-散生していた。側方で連結した6-19個の冬孢子および下部の有刺細胞と吸水性シストで頭状の孢子塊を形成し、数細胞からなる柄で孢子堆から押し上げられていた。*Hapalophragmium derridis* の全生活環は未知であった。本菌の精子器・さび孢子堆は背軸面に突出した小病斑の両面に密生していた。精子器は角皮下生で円錐形-半球形であった。さび孢子堆は表皮下生で癒合し偽護膜状になる側糸で囲まれていた。さび孢子は短柄上に単生、楕円形、倒卵形-洋梨形であった。孢子壁は棘で覆われ、赤道部に2個の発芽孔が認められた。夏孢子堆・冬孢子堆は葉の背軸面に群生-散生し表皮下生であった。夏孢子堆・夏孢子的形態はさび孢子堆・さび孢子と同様であった。冬孢子は長い柄を持ち、多くは基部の2細胞と上部の1細胞からなる3細胞性であったが、*Puccinia* 様の2細胞の冬孢子も混在していた。冬孢子は成熟後直ちに発芽して担子孢子形成していた。

染谷 信孝¹, 諸星 知広², 久勝 順平², 海野 佑介³, 窪田 昌春¹, 竹内 香純⁴

¹農研機構・野菜花き, ²宇都宮大・院工, ³環科技研, ⁴農研機構・生物機能

「*protegens* = Plant-protecting organism from soil-borne phytopathogens」・・・「植物を土壌病害から守る生物」と命名された細菌種、*Pseudomonas protegens*は多様な抗菌物質を産生して植物病原体の生育を抑制する。基準株はスイスの病害抑止土壌から単離され、その後、北南米などでの単離例が報告された。当グループは日本国内の様々な植物根サンプルから3,000株を超える*Pseudomonas*属細菌株を単離してスクリーニングした結果、*Pseudomonas protegens*と推定される菌株を7株選抜した。うち一株についてゲノム解析を行った結果、*P. protegens*基準株と全長にわたり98.47%の相同性を示し、その他特性と併せて*P. protegens*であることを同定し、アジア地域で初めての単離例とした。また、*P. protegens*に近縁ではあるが、ゲノム解析の結果から別種と推定される菌株7株も選抜した。これらの菌株について、*Rhizoctonia solani*によるキャベツ苗立枯病に対する防除試験を行った結果、両種共に発病抑制効果を示した。*P. protegens*は少なくとも4種類、近縁別種は3種類の抗菌物質生合成遺伝子の保有が認められたため、両種の病害抑制効果の作用機作を解析するために各抗菌物質生合成遺伝子の欠損株を作成した。その結果、*P. protegens*においては抗菌物質2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) 及びpyrrolnitrin (PRN) の生合成遺伝子の保有が重要であることが確認された。一方で近縁別種については、植物病原体に対する抗菌要因ではあるが植物体にも有害な物質rhizoxin (RXN) 欠損株において、病害抑制効果は低下しないにも関わらず植物体への阻害作用の低減が認められた。本報告では、作用機作の明確な微生物農業の候補として日本産*P. protegens*種の有用性・可能性を紹介する。

月星 隆雄¹, 芝田 英明², 村上 要三³, 栗坂 信之²¹農研機構・西日本農研, ²愛媛県農林水産研究所, ³愛媛県病害虫防除所

日本では各地でPhytophthora属菌による重要な疫病が発生している。1990年代には晩夏に富山県でハボタン苗が萎凋枯死する病害が発生した。初め下葉が黄化あるいは赤変し、地際茎部には黒褐変症状が認められて軟化し、表面には白色の菌糸が発生した。根表面および主根内部も褐変し、外側の葉から黄化が始まる。激発時には葉が脱落し、株は欠失した。罹病根部から高頻度でPhytophthora属菌が分離され、V8培地上で白色ビロード状のコロニーを形成、5～30℃で生育し、適温は30℃であった。遊走子のうは無色、楕円形～倒洋梨形、乳頭突起は不明瞭、28-60×19-36μmで、発芽して遊走子を放出した。分離菌はP. cryptogea標準株と交配して、無色、球形、直径32-41μmの造卵器を形成し、1個の造精器を底着した。rDNA-ITS領域の塩基配列からNJ法により分子系統樹を作成し、P. cryptogea標準株と同じクレードに属することを確認し、本菌を標準菌と同種と同定した。また、ハボタン品種（白すずめ、白たか、紅すずめ）をポットに植え、株元に本菌を接種、2日間湛水後、25～30℃のファイトロンに7日間保ったところ、原病徴を再現した。以上の報告から、本病はハボタン疫病と命名された。本菌は被害植物体内の卵胞子で越冬し、これが翌年の伝染源となると推定される。水田転換畑などの排水不良地や冠水したような圃場で発生しやすい。また、2015年には愛媛県下のサトイモ産地で突発的に疫病が発生し、病原菌はP. colocasiaeで、27～30℃で被害が最も大きくなる。同様に遊走子によりまん延するため、湿潤な圃場での発生が多い。本病は宮崎県および鹿児島県でも激発している。しかし、連作圃場で多発するものの、種芋の伝染源としての役割など生態的に不明な点も多い。本報告では両菌種の分子系統比較を行うとともに、その対策の可能性について論議する。

佐藤 豊三¹, 廣岡 裕史², 菱田 敦之³, 林 茂樹³, 安食 菜穂子³, 飯田 修³, 川原 信夫³, 田村 隆幸⁴, 辰尾 良秋⁵, 村上 芳哉⁵, 高尾 泰昌⁵, 黒崎 文也⁵, 一木 (植原) 珠樹¹, 根本 博¹

¹農研機構・遺資セ, ²法政大・植物医科, ³医薬健康研・薬植セ, ⁴富山薬事研・薬植セ, ⁵富山大・薬用植物園

近年、生薬の安定供給を目指して薬用作物の国内栽培が奨励されているが、試験圃場や生産圃場で未知の病害が発生し、中には減収をもたらすものも認められている。そこで、主要な5品目、カンゾウ類（ウラルカンゾウ・スペインカンゾウ）、シャクヤク、オタネニンジン、トウキ類（トウキ・ホッカイトウキ）、ミシマサイコの病変部を国内各地で採集し、それらより病原と思われる菌類を分離した。分離菌株は分離源上あるいは培地上で形成された胞子などの子実体の形態に加え、rDNA-ITS領域と菌株によりLSU（D1/D2領域）や β -tubulin-2遺伝子の塩基配列に基づき同定した。その結果、カンゾウ類より9種32菌株、シャクヤクより19種50菌株、オタネニンジンより4種18菌株、トウキより19種54菌株、ミシマサイコより13種38菌株が分離・同定された。そのうちすでに国内で報告されている病原菌は7種であった。また、2種は中国、韓国あるいは台湾など主に東アジアから報告があり、種未同定の8菌株は海外で報告された種である可能性がある。そのほかの29種は今回新たに5品目の薬用作物から分離された。多犯性植物病原菌*Botrytis cinerea* Pers.はミシマサイコ以外の4品目から、*Fusarium* sp. (the *F. solani* species complex) はミシマサイコとシャクヤク以外の3品目から、*Didymella bellidis* (Neerg.) Q. Chen & L. Caiはカンゾウ類とオタネニンジン以外の3品目から、*Pestalotiopsis* sp. はトウキ類とオタネニンジン以外の3品目からそれぞれ分離された。分離源の被害の状況や分離率より*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.は暖温帯のウラルカンゾウに、*D. bellidis*はトウキなどに、*Alternaria*属菌2種および*Colletotrichum*属菌5種はトウキに、*Colletotrichum aenigma* B.S. Weir & P.R. Johnst.はシャクヤクおよびミシマサイコに病原性を示す可能性がある。これらの菌株は全て農業生物資源ジーンバンクに登録・保存した。今後、分離源植物に対する接種試験によりそれらの病原性を確認する。本研究の一部は、平成26年度厚生労働科学研究費補助金、平成27年度日本医療研究開発機構委託研究「薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究」、平成28年度農林水産省委託プロジェクト研究「薬用作物の国内生産拡大に向けた技術の開発」により実施した。

上木 厚子¹, 大瀧 斉美¹, 加来 伸夫¹, 石岡 徹², 竹原 利明²¹山形大・農, ²西日本農研センター

【目的と方法】畑土壌に植物バイオマスを鋤き込み、灌水した後シートで覆って約3週間還元処理する土壌消毒法が、薬剤を用いない生物的土壌消毒法(Biological Soil Disinfestation, BSD)として注目されている。処理土壌中に増殖してくる嫌気性細菌が生成する有機酸や酵素、植物由来の抗菌物質等が複合的に作用して植物病原菌を抑制・殺菌するものと推察される。本研究は、病原菌を死滅させる効果を示したBSD処理土壌から分離した嫌気性細菌株（H110株、TB8株）を用いて、BSD処理における嫌気性細菌の機能を明らかにすることを目的とした。病原菌としてハウレンソウ萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* M2-1株を用い、嫌気性細菌は通常グルコース1%(w/v)を含むPYG培地で、M2-1株はPDA培地でそれぞれ培養した。

【結果】嫌気性細菌株は共にグラム陽性・孢子形成桿菌で、種々の炭水化物を発酵して酢酸、酪酸、ブタノール等を生成した。表現型の特徴と16S rRNA 遺伝子塩基配列の類似性(99%以上)から、2菌株はいずれも *Clostridium beijerinckii* と同定した。子嚢菌細胞壁の主な成分であるキチン、キトサン、グルカンのうち、2菌株はキトサンと β -1,3グルカン（カードランとラミナリン）を分解し、さらにM2-1株の培養菌体から調製した糸状菌細胞壁も分解した。M2-1株をPYG培地に接種して嫌気的に30°Cで3週間程度保温しても、接種時の10~30%程度の菌数が生残していたが、保温開始時に各嫌気性細菌株も同時に接種すると、その増殖に伴いM2-1株は検出されなくなった。さらにM2-1株の菌糸をマット状に増殖させたPDA平板の薄片を添加したPYG培地に各嫌気性細菌株を接種して保温し、寒天薄片を培地から適宜取り出して菌糸細胞を顕微鏡観察すると、1~2週間後には菌糸細胞は形をとどめないまでに破壊されていた。2菌株は子嚢菌細胞壁成分分解性の抗菌性酵素を持ち、これによりハウレンソウ萎凋病菌のような植物病原菌を死滅させる能力を持つと結論した。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業課題番号27016C「中山間の未利用有機性資源を活用した人にも環境にもやさしい土壌消毒技術の実用化」で実施した。

鈴木 浩之, 山岡 裕一
筑波大学生命環境系

*Coleosporium*属菌はマツの葉さび病を引き起こす植物寄生菌である。精子・さび孢子世代をマツ属植物針葉上で、夏孢子・冬孢子世代を種ごとに異なる中間宿主上で過ごす。担子孢子は成熟した冬孢子から飛散し、マツ属植物の針葉へと感染する孢子である。担子孢子的発芽様式は、直接発芽と二次担子孢子的形成する間接発芽が知られているが、発芽温度特性や乾燥耐性についてはほとんど研究されてこなかった。しかし、こうした孢子的生理・生態的特性は、宿主への感染戦略に大きく関わっていると考えられる。そこで本研究では、*Coleosporium*属菌4種 (*C. phellodenri*, *C. lycopi*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae*) の担子孢子的発芽温度特性および乾燥耐性に着目し、アカマツへの感染戦略を明らかにしようと試みた。発芽温度特性を明らかにするため、野外で採取した各種の冬孢子的を湿室に入れ、5~30℃の各温度で24時間培養し、1%寒天培地上に担子孢子的を落下させた。顕微鏡下で100個以上の担子孢子的を観察し、発芽率(=直接発芽率+間接発芽率)を計算した。また、乾燥耐性を明らかにするため、野外から採取してきた各種の冬孢子的を湿室に入れ6時間培養し、スライドガラス上に担子孢子的を落下させた。5~30℃の各温度で担子孢子的を12時間乾燥させたのち、再び湿室に入れ12時間培養した。100個以上の担子孢子的の乾燥後と再培養後の状態を比較し、新たな発芽や発芽管の伸長が認められた孢子的の数から生存率を計算した。各種の担子孢子的は落下が確認された全ての温度範囲で75%以上の高い発芽率を示した。間接発芽率は種によって大きく異なった。*C. phellodendri*は他種に比べ高く、本実験の培養温度範囲では最大で90%を示した。*C. lycopi*および*C. asterum*は最大で約10%であったが、*C. clematidis-apiifoliae*では最大で2.3%であった。一方、5~30℃の温度範囲における乾燥に対し、最も高い生存率を示したのは*C. clematidis-apiifoliae*で19.2%であった。*C. lycopi*および*C. asterum*の生存率は最大で約5%であったが、*C. phellodendri*の担子孢子的はいずれの温度においても0%であった。これらのことから、間接発芽を繰り返し、針葉へ達する確率を上昇させる戦略と、針葉へ到達した担子孢子的が確実に侵入できるよう日中の乾燥に耐えるという2つの戦略がトレードオフの関係にあり、種によって採用する戦略の傾向が異なることが示唆された。

一木 (植原) 珠樹, 大橋 美保, 埴橋 志穂美, 青木 孝之, 澤田 宏之, 永井 利郎, 花田 薫,
藪中 恭子, 杉本 るり子, 中島 比呂美, 熊谷 みどり, 竹谷 勝, 山崎 福容, 根本 博
農研機構 遺伝資源センター

農業生物資源ジーンバンク微生物部門が保有する植物ウイルスに関する各種情報の高度化のため、ウイルスの外被/外殻タンパク質遺伝子領域の塩基配列を解析し結果を公開している。解析の過程において、寄託時に記載された植物ウイルス種の特異的プライマーでは遺伝子の増幅が出来ず、解析が進められなかったウイルスを対象に、次世代シーケンサー(NGS)を用いて再解析を試みた。多くの植物ウイルスはRNAをゲノムとするため、まずジーンバンクで分離しガラスアンプルにて保存中の感染葉の乾燥凍結サンプルからRNeasy plant mini kitでtotal RNAを抽出し、植物由来のリボソームRNAを除去した後断片化を行い、次世代シーケンサー-Ion PGMを用いて網羅的RNA-seqを行った。解析ソフトGenomics Workbenchにより、得られた配列から不明瞭な塩基配列を除去し、NCBIで公開されているウイルス・ウイロイドデータベースをレファレンスとしてLength Fraction0.5およびSimilarity0.6でマッピングを行ったところ、*Southern bean mosaic virus*(SBMV)として寄託されたMAFF 307034およびMAFF 307035は2012年に韓国で報告された*Sobemovirus*属の*Soybean yellow common mosaic virus*(SYCMV)のほぼ全長領域にマッピングされた。MAFF 307034は1971年、MAFF 307035は1984年にダイズから分離され、電顕観察、血清および接種試験でSBMVとされていたが、これら2株は現在の*Sobemovirus*属の種の判別基準(ゲノム全長塩基配列が75%以下の相同性の場合は別種)に基づき、SYCMVと再同定することが適当と考えられた。また*Potato virus M*(PVM)として寄託されたMAFF 307027はNCBIに登録されているPVMの全長配列約8500塩基中2500塩基程度しかマッピングされず、残りの部分をダイレクトシーケンス法で解読している。NGS解析は近年新規ウイルスの探索や解析に多く用いられているが、従来の手法では判別できず、推定が困難なウイルス株を効率的に再解析する際にも有効であると思われる。

森本 晶¹, 新村 昭憲²¹農研機構北海道農業研究センター, ²道総研上川農業試験場

【目的】 ふすまの定植前土壌混和はトマト褐色根腐病の被害軽減に有効とされ、我々の予備試験からネギ黒腐菌核病に対しても同様の効果があることが示唆されている。この効果には土着微生物の関与が考えられているが、その作用メカニズムはよく分かっていない。一方、ネギ黒腐菌核病は高pH条件で発病が抑制されることが知られ、転炉スラグによる土壌pH矯正が有効な耕種的対策として期待されている。しかし、ふすま混和のような他の耕種的技術と組み合わせた場合の効果については知見がない。本研究では、ふすまの定植前混和と転炉スラグによる土壌pH矯正を単用もしくは併用した場合のネギ黒腐菌核病の発病軽減効果を評価するとともに、処理に伴う土壌細菌群集の変化を解析することでその作用機作解明の糸口を得ることを目的とした。【方法】 上川農業試験場場内の人工発病ハウスに、無処理対照区、ふすま混和区（250kg/10a）、転炉スラグpH7.5区（2t/10a）、転炉スラグpH8.0区（3t/10a）、ふすま+転炉スラグの併用区等からなる処理区を各4反復設け、処理10日後にネギを定植した。4ヶ月間ネギを栽培して黒腐菌核病の発病状況を調査するとともに、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGEと定量PCRによって土壌細菌群集の変化をモニタリングした。さらに、特徴的な変化がみられた時期の試料についてはMiSeqによるアンブリコンシークエンシングを行い、細菌群集の構成を詳しく解析した。【結果】 ネギ黒腐菌核病の発病は、転炉スラグによる土壌pH矯正あるいはふすまの混和によって軽減される傾向を示し、両者を併用することでその効果はさらに高まった。ネギ定植時（各処理10日後）の土壌中の細菌密度（16S rRNA遺伝子のコピー数）は、ふすまを施用した区で有意に高く、PCR-DGGEパターンの解析から *Arthrobacter* sp.等の複数の細菌群がふすまの施用にともなって優占することが示された。アンブリコンシークエンシングの結果からもこうした傾向が裏付けられた他、*Pseudomonas* sp.等の一部の細菌群はふすまに転炉スラグを併用することでより顕著に増加することが分かった。ふすまと転炉スラグの併用処理にともなうネギ黒腐菌核病の発病軽減には、これらの細菌群が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

日恵野 綾香¹, 大坪 佳代子¹, 須賀 晴久², 景山 幸二¹¹岐大流域研セ, ²岐大生命セ

植物病原菌*Phytophthora*属菌は輸入検疫の対象であるが*P. nicotianae*のみが国内既発生種として検疫対象外となっている。本研究では*Phytophthora*属菌および*P. nicotianae*を同時に検出する方法を確立するため、*Phytophthora*属プライマー、*P. nicotianae*特異的プライマー（rDNA-ITS領域、Li et al., 2011）、およびDNA抽出の成否を確認するための植物ユニバーサルプライマー（*cox*領域、Martin et al., 2004）のTriplex PCRを検討した。はじめに、*cox1*、*cox2*および*Ypt1*遺伝子の中から特異性の高い*Ypt1*領域を選択した。既報告の属プライマー（*Ypt1*領域、Schena et al., 2008）を参考に22組の改良プライマーを作出し、1組を選抜した。選抜したプライマーは*Phytophthora*属菌104種166菌株のDNAを増幅することができ、*Pythium*属菌37種53菌株、*Phytophythium*属16種31菌株、*Aphanomyces*属菌1種、および他の病原菌6種のDNAを増幅しないことを確認した。次に、本プライマーでPCR 酵素11種類を比較したところTaKaRa Taq Hot Start Versionが最も増幅効率が高く非特異増幅を生じないことが明らかとなった。選抜したプライマー、酵素を用いて、まず植物および属プライマーのDuplex PCRで反応液中のMg²⁺濃度を検討したところ、2.5 mMにすることで罹病組織から抽出したDNAを安定して増幅できた。また、プライマー濃度は植物プライマーを属プライマーの1/10濃度にするすることで2つの標的が偏りなく増幅された。続いてTriplex PCRでは*P. nicotianae*プライマーも植物プライマーと同様に1/10濃度にするすることで3つの標的が偏りなく増幅できた。Triplex PCRの検出感度は100 fgであり、属プライマーを単独で用いた場合と同等であった。本法を用いて*P. capsici*接種植物（カボチャ）、*P. nicotianae*接種植物（トマトおよびナス）および自然汚染植物（ニチニチソウおよびタバコ）の罹病組織から簡易抽出したDNAを用いて検定を行ったところ、標的の有無を正確に判定することができ、輸入検疫における本検出法の実用性を確認することができた。

金澤 恵¹, 石川 美友紀¹, 三星 暢公¹, 紀岡 雄三¹, 野口 勝憲¹, 福吉 賢三², 菅 康弘²,
富濱 毅³, 白尾 吏³, 森 清文⁴, 境 雅夫⁵, 池永 誠⁵, 岡崎 和之⁶, 池田 成志⁶

¹片倉コープアグリ株式会社, ²長崎県農林技術開発センター, ³鹿児島県農業開発総合センター, ⁴鹿児島県農業開発総合センター
大隅支場, ⁵鹿児島大学, ⁶北海道農業研究センター

ジャガイモの主要産地である北海道、長崎県、鹿児島県では、そうか病被害が収量低下の主因の1つとなっている。そうか病は酸性土壌では発生しにくいとされてきたが、近年では低pH環境下での被害も広がり、土壌の理化学性からの対策のみではそうか病の防除が困難になりつつある。そこで、土壌微生物叢の改善によってそうか病の軽減効果が期待できる微生物資材及び土壌改良資材等の開発、さらにはそれらを組み合わせた新規栽培体系の提案を目的として、有用微生物と有機質資材の選抜試験を行った。長崎県農林技術開発センターと鹿児島県農業開発総合センターにおいてそうか病を人為的に発生させた精密圃場で栽培試験を行ったところ、大麦醗酵濃縮液を種いもコーティング処理または全層処理した区および生米ぬか処理区においてそうか病の発生を軽減する傾向がみられた。栽培期間中の各試験区土壌や塊茎表面の微生物群集構造に違いがみられたことから、これら資材によるそうか病軽減効果はジャガイモ根圏、特に塊茎表面の共生微生物叢の変化に起因するものと推察した。そこで、無処理区と比較して大麦醗酵濃縮液処理区や生米ぬか処理区の塊茎表皮において分離比が高かった共生微生物の中から芽胞や胞子を形成するものを中心に選抜し、屋内ポット試験によってそうか病軽減効果を検証した。同時に、大麦醗酵濃縮液、生米ぬかを含む各種の肥料・資材についてもそうか病軽減効果を検証した。2回の選抜試験から有用微生物を5菌株、資材を6資材選抜した。続く3,4回目の選抜試験において、有用微生物と資材の選抜及びより効果的な処理方法（単独／併用処理、全層／種いもコーティング処理等）の検討を行った結果、幾つかの組み合わせにおいて、より高い、あるいはより安定したそうか病抑制効果が認められた。本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（管理人：農研機構生物系特定産業技術研究支援センター）の支援を受けて行った。

西岡 友樹¹, 須賀 晴久², 清水 将文¹¹岐阜大・連合農学, ²岐阜大・生命セ

ネギの混植やタマネギの輪作には、土壌伝染性のウリ類つる割病の発生を抑制する効果がある。我々は、このウリ類つる割病抑制効果には、ネギ類の栽培により土壌に集積する微生物が関与するものと考え研究を進めている。本研究では、ネギ類の栽培土壌中に存在するいずれの微生物群がウリ類つる割病抑制に重要であるかを検討した。まず、ネギ類の栽培土壌に集積する微生物がウリ類つる割病抑制に関与するのかを明らかにするため、ネギ、タマネギおよびキュウリを栽培した土壌と非栽培土壌を、40、60、80、121℃で30分間加熱処理した後、各土壌にキュウリつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*; 以下、FOC) を接種し、そこへキュウリを播種した。播種3週間後にキュウリ苗の発病を比較したところ、無処理キュウリ栽培土壌区および無処理非栽培土壌区では激しく発病したが、無処理および40℃処理のネギ類栽培土壌区では有意に発病が抑制された。しかし、60℃以上で処理したネギ類栽培土壌区では、その発病抑止性が完全に消失した。ネギ類栽培土壌中の細菌および糸状菌数を計測した結果、60℃処理でグラム陰性細菌および糸状菌の生息数は減少していたが、グラム陽性細菌数は変化していなかったことから、ネギ類栽培土の発病抑止性にはグラム陰性菌または糸状菌が関与するものと推察された。そこで次に、ネギ栽培土壌および非栽培土壌の希釈液に40℃と60℃の加熱処理または抗細菌剤添加を行った後、PSB培地と混合し、GFPラベルしたFOC (以下、GFP-FOC) を接種して振とう培養した。培養16時間後に各培養液中のGFP-FOC数を蛍光顕微鏡下で測定したところ、無処理ネギ栽培土壌添加区では無処理非栽培土壌添加区よりもGFP-FOC数が有意に減少していた。また、40℃処理ネギ栽培土壌添加区でも同様にGFP-FOC数が減少したが、60℃処理および抗細菌剤処理したネギ栽培土壌添加区では菌数の減少は認められなかった。以上の結果から、ネギ類の栽培により土壌中に集積するグラム陰性拮抗細菌が、ネギ類の混植・輪作によるウリ類つる割病抑制のキープレイヤーであると考えられた。

鮎川 侑¹, 小松 健², Martijn Rep³, 有江 力²¹農工大院連農, ²農工大院農, ³Univ. of Amsterdam

土壌伝染性植物病原菌 *Fusarium oxysporum* は菌株によって特異的な宿主範囲を有し、120以上の分化型 (f. sp.) に区別されている。近年、トマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* から病原性関連遺伝子 *SIX* 群が座乗する小型染色体が見出され、この小型染色体が生存に必須でないが病原性に必須なCD染色体であることが特定された (Vlaardingerbroek 2016) が、他の f. sp. では病原性に関連するCD染色体は特定されていない。キャベツやシロイヌナズナなどに病原性を示すキャベツ萎黄病菌 f. sp. *conglutinans* Cong:1-1株では、約2.2 および2.0 Mbの小型染色体に *SIX* 群が座乗することが報告されている (Kashiwa 2017)。そこで本研究では、Cong:1-1株のこれらの小型染色体がCD染色体であるかについて調査した。Cong:1-1株の2.0 Mb小型染色体が生存に必須か否か確かめるために、2.0 Mb染色体をハイグロマイシンB耐性遺伝子 *hph* でラベルしたCong:1-1株を、チューブリン重合阻害剤であるベノミル (1.56 μ g/ml) で処理 (VanEtten 1998) し、薬剤感受性を指標に小型染色体喪失株の選抜を試みた。選抜株のDNAを用いてPCRによって *SIX* 群の検出を試み、その検出パターンに基づいてタイプ1-3に分類した。キャベツへの接種試験の結果、タイプ1の病原性は親株に比べて有意に低下したが、タイプ2およびタイプ3の病原性は親株と比べて有意差はなかった。パルスフィールドゲル電気泳動の結果、タイプ1株では、2.2および2.0 Mbの染色体が検出されなかった。一方、2.0 Mb染色体に *hph* を導入したCong:1-1株、および任意染色体にゼオシン耐性遺伝子 *ble* を導入した非病原性 *F. oxysporum* Fo47株を共培養したところ、両薬剤耐性株を得た。2.0 Mb小型染色体を獲得したFo47株がシロイヌナズナへの弱い病原性を示した。以上のことからCong:1-1株の2.0 Mb染色体がCD染色体であることが示唆された。

北出 雄生¹, 泉津 弘佑², 住田 卓也¹, 田中 千尋¹¹京大・院農, ²滋賀県大・環境科学

トウモロコシこま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) はトウモロコシの最重要病原菌の一つである。本菌では逆遺伝学的手法により、多数のシグナル伝達因子の解析が進められてきた。前回大会において、本菌の CLA4 PAK様キナーゼが病原性、形態形成ならびに細胞極性を制御する主要シグナル伝達因子のひとつであることを報告した。上記において顕著な異常を示す *CLA4* 遺伝子破壊株 ($\Delta cla4$) のコロニーからは、異なる形質を示す変異セクターがしばしば生じた。そのうちの一つは菌糸生育、細胞極性ならびに病原性において、部分的な回復を示した。また、継代培養を繰り返した場合でも形質が非常に安定しており、遺伝子レベルで突然変異が生じたものと思われた。そこで我々は本株を Mut1 株と名付け、*CLA4* 遺伝子の欠損を部分的に相補する *Mut1* 突然変異遺伝子を有しているとの仮説を立てた。この仮説をメンデル遺伝学的に検証するために野生株との交配試験を実施した。その結果、Mut1 株は重度の稔性低下を示し、子孫解析は困難であった。次に、Mut1 株に *CLA4* 遺伝子を再導入した菌株を作出した。再導入株は菌糸生育や有性生殖において、野生株と同様の形質を示した。よって、Mut1 株に生じた形質変化は *CLA4* 遺伝子欠損時に特異的であることが明らかとなった。現在、再導入株と野生株の交配試験により、*Mut1* 突然変異遺伝子の存在をメンデル遺伝学的に検証している。

長谷川 琢也¹, 岡部 淳², 加藤 雄亮², 川出 洋¹, 夏目 雅裕¹¹東農工大・連農, ²東農工大・院農

【目的】 植物病原細菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は植物の根滲出物に対する走化性誘引応答を利用し宿主植物へ接近することで、感染の促進や宿主の識別を行うことが報告されている。これまでにトマトの根滲出物に含まれる数種のアミノ酸・有機酸が青枯病菌の走化性誘引物質として働くことが見出されているが、これらの物質は多くの植物が根滲出物として土壤中に放出していること、他種の細菌も走化性誘引応答を示すことから、宿主の選択性をこれらの物質では十分に説明することはできない。我々はアミノ酸や有機酸のような普遍的な物質の他に、宿主植物に特異的な走化性誘引物質も青枯病菌の感染に重要な役割を果たしていると考えた。前報で我々は、トマトの根滲出物を活性炭カラムで精製し、その活性炭吸着画分に未知の誘引活性物質の存在を見出したことを報告した。本報はこの未知の誘引物質の更なる解明を行ったものである。【方法】 トマトを10日間水耕栽培することで根浸出液サンプルを回収した。浸出液に含まれる走化性誘引物質は、Sep-Pak C-18・活性炭・DIOLシリカゲル・NH₂ シリカゲル等の担体を用いて精製し、各画分の活性はシャーレ上にスポットした青枯病菌がペーパーディスクに染みこませたサンプルへ移動する距離を指標とする軟寒天培地法で評価した。【結果および考察】 上記の担体を用いたカラムクロマトグラフィーで段階的に精製を行い誘引活性の追跡を行った結果、HPLC において単一のピークが検出されたことより誘引活性物質を単離したことが示された。また各種精製方法を試行する過程で誘引活性物質の以下の特徴を見出した。1. 活性炭に吸着しSep-Pak C-18には吸着しないことから中-低程度の極性の化合物である。2. イオン交換カラムに吸着しないことから中性の化合物である。3. α -ナフトール硫酸試薬で呈色したことから糖を構成成分として含む化合物である。これらの特徴から、本活性物質は青枯病菌の走化性誘引物質として報告されていない未知の糖含有化合物であると期待される。今後、MS や NMR を用いて最終的な構造解析を行う予定である。

丸山 望¹, 石賀 貴子¹, 石賀 康博², 別役 重之², 尾花 望², 一瀬 勇規³, 野村 暢彦²¹筑波大・院生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³岡山大・院環境生命

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-細菌間相互作用の解明が求められる。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・増殖・攻撃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。Biofilm形成や植物体侵入時の運動性は感染初期段階である病原性細菌の植物への接着・付着に重要だと考えられる一方、植物葉上での細菌の運動性や集団形成をリアルタイムイメージングによって観察、解析した報告例はない。植物葉上で実際に細菌がどのような運動性を示すのか、また、どのような運動性が付着・侵入に寄与するのかについては不明な点が多い。そこで、本研究では顕微鏡法を用いた一細胞レベルでの観察によって植物葉表面における微生物の挙動・局在を明らかにし、植物-細菌間相互作用や病原性発現機序の解明を目指した。まず、病原性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* 病原性関連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)を解析した。本菌の運動性であるSwimming, Swarming, Twitchingが顕著に低下した運動性関連遺伝子欠損株($\Delta fliC$, $\Delta pilA$, $\Delta motABCD$, $\Delta fliC\Delta pilA$)4株を選抜し、GFPを挿入した株を新たに作成した。各株をタバコ植物 *Nicotiana tabacum* の剥離表皮細胞に植菌し、COCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy) 法と蛍光検出法を組み合わせたリアルタイムイメージング系を用いて剥離表皮細胞とさらにその上に付着した *P. syringae* pv. *tabaci* を同時に観察した。上記の手法を用いることによって、植物細胞上における細菌の局在や植物葉上での細菌の運動性をリアルタイムで観察することが可能であった。本発表では、各種病原性関連遺伝子の中でも運動性に関与すると考えられる欠損株を用いて付着・侵入・増殖・攻撃と続く感染行動がどのように変化するか、またその結果としてどのように病原性低下に帰結するのかに関して、現在までに得られた結果について報告する。

田森 悠美¹, 山田 博之¹, 勝山 千恵¹, 井上 幸次², 江口 直樹³, 岩波 靖彦⁴, 内川 敬介⁵, 後藤 佳奈⁶, 中村 仁⁷, 久我 ゆかり¹

¹ 広大院総科, ² 岡山農研, ³ 長野果樹試, ⁴ 長野南信試, ⁵ 長崎農技セ果樹, ⁶ 山形農総研セ, ⁷ 農研機構果樹茶部門

温水処理法はナシ樹の白紋羽病の治療法として開発され、根の周囲に50℃の水の点滴を、地下10 cm が45℃（危険温度）あるいは30 cmが35℃（目標温度）に達するまで行う方法である（定法）。本法はナシ、リンゴ、ブドウで高い治療効果が報告されており、現在、熱耐性が弱い果樹に適用するため、点滴水温および危険温度の低温化を検討している（低温法、各45℃および43℃）。定法による白紋羽病菌（*Rosellinia necatrix*, Rn）の衰退現象には、菌糸近傍（菌糸圏）における細菌数の増加および*Enterobacter* 属種の優占化など、土壌微生物要因の関与が強く示唆されている。本研究では、圃場で行った定法（点滴水温50℃または55℃）および低温法による温水処理後のRn菌糸圏の細菌および真菌群集を明らかにすることを目的とした。定法では自然感染罹病樹（1県5圃場10本）および接種した罹病樹（1県1圃場6本）、および低温法では接種した罹病樹（3県3圃場10本）を用いた。処理から1～2か月後、罹病根あるいは接種源（Rn培養枝）を回収し、滅菌水中で振とうし、振とう液の遠心沈殿を菌糸圏微生物群集試料とした。DNA抽出後、16Sおよび18S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGE法により細菌相および真菌相を解析し、バンドの塩基配列を推定した。その結果、これらほとんどすべての処理区で明瞭なRnのバンドは検出されず、堀上調査および培養枝を用いた死滅の判定とほぼ一致した。定法の自然感染樹の菌糸圏細菌相および真菌相は圃場ごとに特徴的なDGGEバンドパターンを示したが、すべての樹で細菌では*Enterobacter*属および*Rhizobium*属、真菌では*Trichoderma*属または*Fusarium*属のいずれか、あるいはいくつかの種の位置にバンドが検出された。3県で行った低温法ではこれらに加え、*Penicillium*属の種が全圃場のすべてあるいはいずれかの樹で検出された。接種試験の定法と低温法間のバンド数の比較により、細菌相および真菌相ともに後者が有意に高かった。以上のことから、温水処理後の衰退したRnの菌糸圏微生物相は圃場ごとに特徴を有するが、定法および低温法とともに数種の細菌種および真菌種が優占化し、またこれらの属に共通性がある可能性が示唆された。

荒川 征夫¹, 牧田 結衣¹, Cristian J. Cumagun², Paulo C Ceresini³, Bruce A McDonald⁴¹名城大・農学部, ²UPLB・The Philippines, ³UNESP・Brazil, ⁴ETH Zurich・Switzerland

日本国内に分布するイネ紋枯病菌の地域個体群は、マイクロサテライト（SSR）マーカーによる集団遺伝学解析の結果、遺伝型構成が北海道から九州にかけた広範囲で近似する一方、沖縄地域の個体群は有意に異なる遺伝型構成を示ことが明らかとなっている。日本における本病原菌の伝来が多経路である可能性を想定し、韓国、九州、沖縄本島、石垣島、台湾およびフィリピンの7地域より採集した計339菌株を用い、9種類のSSRマーカーによる集団遺伝型解析を行った。フラグメント解析の結果、本菌種は2倍体的な遺伝型を示し、地域個体群ごとにホモ／ヘテロ接合性頻度の違いが確認された。各地域個体群内で検出された同一遺伝型の菌株（33.3～89.0%）を重複クローンとして扱い、これらを含まないデータセットでSSRマーカーごとのアリール構成頻度を確認した。7地域の個体群のなかで、韓国、九州および沖縄本島の3個体群間は概してアリールの共有性が高いと同時にそれらの構成頻度も近似した。一方、石垣島、西表島、台湾およびフィリピンの個体群は、それぞれの主要アリールの構成頻度が異なると同時に固有アリールが個々に検出される傾向があった。これらの個体群間における親縁係数（ペアワイズ F_{ST} ）を求め、遺伝型構成の有意差を検定した。その結果、韓国、九州および沖縄本島個体群間で F_{ST} 値は0.010–0.017を示し、有意差が認められなかった（ $P < 0.05$ ）。その他の組み合わせで F_{ST} 値は0.039–0.421を示し、5%～0.1%レベルで有意差が確認された。ソフトウェアSTRUCTUREを用い、地域個体群間のアリール構成および祖先型の数をシミュレートした。系統（K）の変動値（ ΔK ）が2で最大、4で極大を示し、K=2、3、4および5のときBar Plotは、韓国、九州および沖縄本島の3個体群で1組、また石垣島、西表島および台湾の3個体群で別の1組の類似パターンを示した。対してフィリピン個体群の遺伝型構成は他の地域個体群と比べ、大きく異なるパターンを示した。以上の結果より、韓国、九州および沖縄本島の3地域に分布する本病原菌の個体群間で、遺伝子流動が偏在的に存在する可能性が示唆された。これらに対し石垣島および西表島個体群には遺伝子流動の境界が存在し、台湾およびフィリピンを含めそれぞれ独立した伝来経路を持つ可能性が考えられた。

Hiroyuki Sekiguchi, Koji Nomiyama, Akira Masunaka, Akira Kawaguchi, Toshiaki Takehara, Keisuke Tomioka
WARC/NARO

A fungal isolate of *Fusarium lactis* Pirotta & Riboni causing fruit rot of sweet pepper was isolated in Kagawa Prefecture in the southwest region of Japan, in October 2002. It is preserved in Genetic Resources Center of National Agriculture and Food Research Organization (NGRC), Japan, as an accession MAFF150017. From the isolate, we generated nitrate non-utilizing mutants useful as markers for analyzing fungal ecology, vegetative compatibility, pathogenic specialization, etc. Mutants tolerant to chlorate (potassium chlorate) were obtained from the isolate, and their phenotypes based on utilization of five nitrogen sources (sodium nitrate, sodium nitrite, ammonium tartrate, hypoxanthine and uric acid) were determined through incubation on cultural media supplemented with respective nitrogen sources. Consequently, they were the following phenotypes: *nit1* (non-utilizing sodium nitrate), *nit3* (non-utilizing both sodium nitrate and sodium nitrite) or NitM (non-utilizing both sodium nitrate and hypoxanthine), and confirmed to be pathogenic to fruits of sweet pepper as same as the wild type (MAFF150017). Ecological and other studies for fruit rot of the plant are expected to develop using the mutants in future. Representative mutants for each phenotype were deposited in NGRC, as the accessions MAFF150057-150065 (*nit1*: MAFF150057-150060, *nit3*: MAFF150061-150064, NitM: MAFF150065).

辻 元人¹, 石田 理子¹, 道家 章生², 杉山 暁史³, 木村 重光⁴, 久保 中央^{1, 4}¹京府大院・生環, ²京都府・農技セ海洋セ, ³京大・生研, ⁴京都府・農技セ生資セ

海藻は多糖類やミネラル、ポリフェノール等を多く含んでおり、ヒトの健康維持に重要な役割を担うと考えられている。島国である日本において海藻は食用のみならず、古くから田畑の肥料として作物生産にも広く利用されてきた。しかしながら、それらを利用した病害防除に関する検討事例は極めて少ない。そこで本研究では国内の主要な土壌病害である根こぶ病および立枯病に対する海藻粉末の発病抑制効果について検討した。市販の有機質資材の原料である北欧産褐藻アスコフィラムノドサム

(AN)、京都府が養殖化を進めている褐藻アカモク (SH) を含む6種の海藻粉末をそれぞれ根こぶ病菌汚染土壌に混和し、セルトレイを用いた接種検定法により発病度を調べた。その結果、ヒジキを除くすべての海藻粉末において発病度の低下が認められたが、中でもANによる発病抑制効果が最も顕著であった。そこで根こぶ病汚染圃場へのAN施与による発病抑制効果について調べたところ、市販の化学薬剤には劣るものの、無処理区と比較して有意な発病度の低下が認められた。次に立枯病菌抑制効果について調べた。ANおよびSHをそれぞれ立枯病菌汚染土壌に混和し、同様にセルトレイを用いた接種検定を行った。その結果、いずれも無処理区よりも高い発病度を示し、発病が助長される傾向がみられた。一方、ANおよびSHを混和した健全土壌にて一定期間栽培後の植物体に立枯病菌を接種したところ、無処理区と比較して発病度の低下が認められた。最後にセルトレイにおける根こぶ病発病抑制活性を指標として、AN粉末に含まれる活性成分の分画を試みた。その結果、水可溶メタノール不溶性画分において活性が認められ、また加熱処理 (121℃、20分) による活性低下はみられなかった。

齊藤 大幹¹, 佐々木 舞衣¹, 梅村 賢司², 畠山 聡², 倉内 賢一³, 鈴木 智貴^{4, 5}, 小松 健^{1, 6}, 寺岡 徹⁷, 有江 力¹

¹農工大院農, ²Meiji Seika ファルマ (株), ³青森産技セ, ⁴宮城古川農試, ⁵仙台農業改良普及セ, ⁶農工大GIR, ⁷農工大環安セ

【緒言及び目的】

Fusarium oxysporum W5 (以下W5) は、青森県南津軽郡田舎館村のイネばか苗病発生圃場でイネ罹病株の周辺に生育していたイネ健全株から分離した、非病原性菌株である(加藤、2012; 野中、2012)。我々はこれまでに、W5株のbud cell懸濁液をイネ開花時に穎花に噴霧処理することで、ばか苗病菌の種子伝染を低減するとともに、得られた種子の播種時のばか苗病の発病を抑制できることを報告した(加藤ら、2013)。W5株のbud cell懸濁液をイネ開花時に穎花に噴霧処理しておく、10分後にばか苗病菌のbud cell懸濁液を穎花に噴霧接種しても、穎花内部へのばか苗病菌の菌糸進展が抑制される(田中、2014)。そこで本研究では、W5の生物農薬としての作用機作解析および実用化検討の一環として、bud cell懸濁液を穎花に噴霧処理して得たイネ種子でのW5の生残性、その種子から成長した植物体におけるW5の動態を調査した。

【方法】

W5に緑色蛍光タンパク質遺伝子およびジェネティシン耐性遺伝子を導入した株(W5-GFP-GEN^R)を、開花時に穎花に噴霧処理したイネ(cv. 短銀坊主)種子を用いた。収穫した種子を6ヶ月間室温にて保存したのち、粃、穎果(玄米)、精米後の糠(果皮、種皮および胚)、胚乳(白米)それぞれをジェネティシン含有培地に置き、W5-GFP-GEN^Rを選択的に分離した。また、穎果の凍結薄切切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いてW5-GFP-GEN^Rの局在観察を行った。

さらに、W5-GFP-GEN^Rを処理して得た種子を、赤色蛍光タンパク質遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したばか苗病菌(Ff-RFP-HYG^R)のbud cell懸濁液に浸漬して接種し、その後、生育したイネ植物体におけるW5-GFP-GEN^RとFf-RFP-HYG^Rの再分離と、蛍光顕微鏡を用いた局在観察を行った。

【結果及び考察】

6ヶ月間保存した種子の、胚乳と胚以外の、果皮、種皮からW5が再分離された。また、種子から生育したイネの根、子葉鞘、第1～第3葉鞘基部でW5が検出され、W5が穎花への噴霧処理によって、種子を介して次世代のイネ植物体組織に定着することが示唆された。また、W5を処理した場合にばか苗病菌の菌糸伸展の抑制が見られたことから、W5がばか苗病菌とイネ植物体上で「場」を競合することが示唆された。

前田 征之¹, 渡辺 喜芳¹, 中保 一浩²¹新潟農総研, ²農研機構野菜花き研究部門

トマト産地では長年の連作等の影響により、青枯病の発生面積が増加傾向にある。本病の病原菌である *Ralstonia solanacearum* は土壌深層に生残するため、土壌くん蒸剤による土壌消毒やフスマや、米ぬかを用いた土壤還元消毒法では作土層の消毒効果は高いが、土壌深層への十分な効果は期待できない。近年、土壤還元消毒法の資材として液状の廃糖蜜や低濃度エタノールを用いることで、土壌深層部に存在する病原菌に対して高い消毒効果を示すことが報告されている（小原ら、2007）。一方で、液肥混入器の利用と資材コストの高さが産地における普及拡大の妨げとなっており、より簡便でコストを考慮した消毒技術が必要とされている。本研究では、アミノ酸生成過程の副産物である各種資材の中から、水溶性の糖を含む粒状資材として糖含有珪藻土を選抜し、本資材の土壤還元消毒資材としての有効性を、パイアル便を用いた室内実験で評価するとともに、圃場条件下で液肥混入器を用いることなく、従来のフスマや米ぬかによる土壤還元消毒法と同様の作業体系で土壌深層部への青枯病菌に対する消毒効果を検討した。2015～2016年に新潟県内の複数のトマトハウス圃場において本資材を用いて土壤還元消毒を実施した結果、糖含有珪藻土の処理量は0.5t/10aでは圃場用水量以上に灌水しても、十分な消毒効果は認められなかったが、1t/10a以上で地表下60cm程度までの還元化し、土壌中の青枯病菌の密度低減効果が認められた。また、消毒後にトマトを栽培した圃場では、無処理区に比べて青枯病に対して高い防除効果を示し、消毒後にトマトを3作栽培してもその効果は維持されていた。さらに、本消毒法は青枯病だけではなく、ネコブセンチュウや半促成作型で発生する褐色根腐病に対する消毒効果も認められており、糖含有珪藻土による土壤還元消毒法が青枯病をはじめとしたトマト土壌病害虫の防除にも有効であることが明らかとなった。

CHANJIRA AYAWONG¹, JINTANA UNARTNGARM¹, YOSHITAKA ONO²¹Kasetsart Univ., ²Ibaraki Univ.

Four species of *Ravenelia* were newly found at various sites in six provinces of Thailand. *Ravenelia japonica* was found on *Albizia* spp. in Chiang Mai and Leoi province, *R. sessilis* on *Albizia* spp. in Chiang Mai, Lampang and Prajuab Kirikhan provinces, and *R. ornata* on *Abrus pulchellus* and *A. precatorius* in Chiang Mai, Ratchaburi and Kanchanaburi provinces. *Ravenelia ornata* produced uredinia and telia on abaxial leaf surface. Urediniospores were globose or subglobose, densely echinulate, 5 or 6 germ pores and scattered. Paraphyses were light brown, clavate, bulbous at the apex. Teliospore heads were 3-7 spores across. Individual teliospore are one- or two- celled, verruculose wall with tuberculate appendages. Cysts were hyaline and pendulous. The number of cysts were the same as that of marginal teliospores. *Ravenelia* sp. was found on *Pterolobium macropterum* in Lampang province. This fungus produced different spore stages through the season: spermogonia and aecia in July and October, uredinia also in October, and telia in February. Aeciospores were the same as urediniospores in morphology. Urediniospores were elongate obovoid or ellipsoid with truncate base, apically thickened and echinulate, with 2 or 3 equatorial germ pores. Teliospore heads were reddish brown with hyaline, apically 2 or 3 forked tubercles, 3-6 spores across. Cysts were hyaline and pendulous.

NAUNNET THIPHAPHORN, JINTANA UNARTNGARM
Kasetsart Univ.

Rice (*Oryzae sativa* L.) is a cereal grain and the main economic crop of Thailand. The rice dirty panicle disease is the most important disease of rice production in Thailand. Rice dirty panicle is caused by six fungal pathogens of which *C. lunata* is the major pathogen. The purpose of this study was to evaluate the correlation between genotype and pathogenicity of *C. lunata* races. The fungal races were deposited at Kasetsart University Kamphaeng Sean Fungal Collection (KKFC). Five races of *C. lunata* including CNT0301, NPT0810, CMI01161, AYA07256 and NRT07101 were sampled for SSR primers screening. Eight of 13 primers were suitable for genotypic study by ISSR markers. Thirty races of *C. lunata* were genetically analyzed using eight SSR primers including (GTC)₅, GTG(CGA)₅, GCG(CGA)₅, ATC(CGA)₅, (GTG)₅, (AGG)₅, AAT(CGA)₅ and (CGA)₅. The polymorphic bands observed were used for phylogenetic analysis. The results indicated that no correlation was observed among genotype, pathogenicity and locality.

PONPAWEE TIWATWARANIKUL, JINTANA UNARTNGARM
Kasetsart Univ.

In Thailand, cassava (*Manihote sculenta* Crantz) is considered one of the most economically important crops. Stem and root rot diseases are important limiting factors for cassava production in Thailand. Root and stem rots are caused by several fungal species such as *Fusarium solani*, *Foxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Neoscytalidium hyalinum* and *Pythium* spp. The aim of this study was to identify the fungal pathogens using morphological characteristics and molecular data. Cassava root and stem rot was observed and collected from affected areas in Nakhon-Ratchasima and Rayong provinces, Thailand. The infected roots and stems were cleaned and the fungi isolated by the tissue transplanting method and baiting technique. The isolated fungi were observed under the microscope and their nucleotide sequences were analyzed. The sequence results identified a number of species including *F. solani* (4 isolates) *Neoscytalidium hyalinum* (3 isolates) and *Pythium* spp. (6 isolates). In a further study, the morphologically identified species will be inoculated on healthy cassava to determine their pathogenicity.

WANIDA THAMTHURASAN, JINTANA UNARTNGARM
Kasetsart Univ.

Sheath rot disease of rice has been found in many geographical areas of Thailand. This disease is caused by *Sarocladium oryzae* and it is also a causal agent of the rice dirty panicle disease. The aim of this study was to investigate genetic differences among *S. oryzae* isolates from various localities. Twenty samples from seven provinces of Thailand were collected and their morphological characteristics were observed. Observation of colonies showed that there were differences in color (orange-yellow) and growth rate between fungal isolates collected from the central and northeast regions. The inter simple sequence repeat (ISSR) markers were analyzed using ISSR primers including GTG(CGA)5, GCG(CGA)5, ATC(CGA)5, AAT(CGA)5, (GTC)5, (CAG)5, (CAA)5, (GTG)5, TGG, (AGG)5, (CGA)5, (CA)8, (CT)8 and GTT(TCG)5. The results revealed that there were close relationships among fungal isolates collected from the same population. This research further indicated that there was low genetic diversity within populations, but high diversity among populations. Moreover, there was no correlation between morphological characteristics and ISSR markers.

黒西 愛¹, Tuan Watie binti Tuan Mat², Nurshahira binti Yusuf², Romain Blanc-Mathieu¹, 五斗 進³, 緒方 博之¹
¹京都大・化研, ²Universiti Teknologi Malaysia, ³京都大・化研 (現所属: 情シス機構DBCLS)

ウイルスは、海洋、淡水、土壌、人間の消化管の中など、地球上の生命が宿るところ、どこにでも無数に存在している。近年の配列決定技術の進展により、環境サンプル中から数多くのウイルスゲノムの配列が比較的容易に決定できるようになってきた。こうした背景から、病原体の同定や、生態系の解析のために、得られたウイルスゲノム配列を迅速かつ正確に分類する作業が必要となる。では、果たしてウイルス分類をゲノム類似性に基づき行うことは可能か？我々は、ゲノム間の配列類似性と既存の分類体系を比較することにより、この問題を検討した。まず、一つ目の尺度として、平均ヌクレオチド一致度(Average nucleotide identity, ANI)を用いて、ウイルスの種ごとに種内あるいは種間でどの程度の類似性がみられるのかを検討した。ANIの計算方法としては、先行研究で提案されている2種類の方法(ANIdb, gANI)を利用した。ANIdb, gANIの両方において、同種内のANIがどの異種間のANIよりも大きい場合の分布が最も多かった(約86%の種)ことから、ウイルスの種についてANIに基づくウイルス分類がある程度可能であると考えられる。一方、約14%の種では、ANIのみでは正確な判別が困難であることも明らかになった。また、種を判別するための閾値は、種ごとに大きく変動し、54.7%という類似性しかなくても同種である事例もあった。従って、ウイルス全体に対して、唯一のANI閾値を用いてウイルスが同種であるか異種であるか判断することは難しく、ウイルスの種ごとにANIの基準を設定する必要があると考えられる。2つ目の尺度としてGenomic Similarity score (SG)を用いて同様の検討を行った。今後、新たなウイルスゲノム配列を高速に分類する手法として、ゲノムを比較する複数の尺度を考案し、ウイルスの各分類群に適した尺度と閾値を設定することで、様々な分類階級(種・属・科・目など)に柔軟に対応した自動分類器を構築することを目指す。

藤井 美月¹, 永井 航太¹, 岩田 晴花¹, 野々市 元¹, 長谷川 愛¹, 井上 翔太², 秋吉 研二², 佐藤 高則^{1, 2, 3}
¹徳島大・総科・生化, ²徳島大院・総科・生化, ³徳島大院・理工・生化

四国地方には発酵茶が複数存在し、こうした発酵茶を飲用する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。この点から我々は、昨年度徳島県でのみ生産される阿波番茶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た結果、一般細菌の他、発酵性細菌の*Propionibacterium*属や*Klebsiella*属細菌、さらに*Lactobacillus*属など乳酸菌と相同なクローンを見出した。こうした発酵製品中の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と期待されていることから、本研究ではさらに徳島県内で生産される茶葉の微生物相について知見を得るため、徳島県上勝町および三好市で生産される発酵茶および非発酵茶について、クローンライブラリー法による微生物相の解析を行った。

まず、徳島県上勝町産の阿波番茶試料2種(E,F)、三好市山城町および東祖谷山村産の発酵茶1種(SC)と非発酵茶2種(BB,IB)について、茶葉洗浄液より各々ゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型として16SrRNA遺伝子のPCR増幅断片を調製後、pGEM-Tベクターに挿入し、計104クローンのDNA塩基配列決定および相同性解析を行った。

その結果、上勝町産阿波番茶(E,F)では、先に検討した他の阿波番茶と同様に、3種の*Lactobacillus*属細菌および*Klebsiella pneumoniae*に相同なクローンが検出された。これまでの結果と併せ、県東部上勝町および那賀町で生産される阿波番茶では、これらの細菌が存在し、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。

一方、県西部三好市で生産される番茶IBおよびBB(非発酵茶)では乳酸菌は検出されず、土壌細菌や茶葉の葉緑体に相同なクローンが主であったが、発酵茶SCでは*L. plantarum*が最も多く検出され、その他、*Lactococcus lactis*や*Klebsiella*属細菌(*K. oxytoca*, *K. variicola*)の存在も示唆された。これまで三好市で生産される茶葉の微生物相に関する報告はなく、山間部茶葉の微生物相に関する新規の知見を与えられると考えられる。

Kyung-Sook Whang^{1, 2}, Song-Ih Han¹, In-Hwa Jeon², Su-Jin Kim¹, Seung-Yeal Shin¹

¹Department of Microbial & Nano Materials, College of Science & Technology, Mokwon University, ²Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University

Since the 1976, studies on the colony forming curve (CFC) by Hattori and co-workers supplied a great diversity of culture strains. We have hitherto collected large numbers of slow growing oligotrophic bacteria as "**barely culturable bacteria (BCB)**" which was after 1 month incubation and able to grow on a 10⁻⁴ diluted NB medium. The 16S rRNA gene sequences of 643 BCB from various environments revealed that the isolates comprise 7 major groups α -(229 strains); β -(169 strains); γ -(47 strains) *Proteobacteria*, *Actinobacteria*(90 strains), *Acidobacteria*(3 strains), *Firmicutes*(88 strains), and *Bacteroidetes*(17 strains). This low-nutrient, long-term incubation approach can be used to make diverse and novel culture and even if the growth is limited. Among these BCB, 38 type strains were validated in IJSEM. About 40% of the tiny colonies belonging to CFC-III failed to grow when second round of cultivation, i.e. the "**temporarily culturable bacteria (TCB)**". From 123 of these TCB, 113 isolates were successfully determined and aligned with the 16S rRNA gene sequences. Among these TCB, 65 isolates belonged unclassified and uncultured bacteria (similarity, 90-94%). Indeed, Whang's laboratory in recent work has such barely and temporarily culturable bacteria from difficult culture phyla. With further adjustments to media, incubation conditions it should be possible to make pure cultures.

上岡 永佳, 高妻 篤史, 渡邊 一哉
東葉大・院生命

近年、微生物と外界の電気化学的相互作用が注目を集めている。我々は菌が有機物を酸化分解して電流生成を行う微生物燃料電池（MFC）に着目しているが、いまだに効率が十分とは言えず、実用化の障害になっている。また我々は、これまでに水田でも微生物による発電が可能なことを実証し、水田土壌中のアノード電極に付着した微生物群集の分子生態解析やメタゲノム解析を行ってきた。その結果、新種と思われる発電菌がアノードに出現することが明らかとなり、その性質には大きな興味を持たれた。しかし、その存在量は少なく、その後の数年の研究においても未だに単離できていない。そこで本研究では、発電菌を効率よく単離する方法として電極プレート培養（EPC）法を開発し、新奇の微生物を環境中から単離することを目的とした。EPCは培地プレート上に電極を設置し、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニーを形成させる手法である。この研究により、電気活性微生物の多様性や生態に関する基盤情報が拡充されることが期待される。

まずは、電極を唯一の電子受容体とするプレート培養法（EA-EPC）の構築を行った。作用極に透明なFTOガラス電極、対極にチタンメッシュ、参照極にAg/AgClを用い、菌液をプレート表面に塗布後、作用極をその上に被せた。モデル発電菌である *Geobacter sulfurreducens* を酢酸基質のEA-EPCに植菌したところ、作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成も確認された。また、植菌しない条件では電流が流れず、オープンサーキット条件ではコロニーが出現しないことが確認された。約4か月運転した水田発電のアノードを作用極として酢酸を基質とした定電位培養を行い、発電菌のさらなる集積を行った。その後、アノード付着微生物を懸濁し、EA-EPCに植菌した。その結果FTO作用極の下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成も確認された。得られたコロニーについて16S rRNAのシークエンス解析及びBlast解析による菌の同定を行ったところ、発電菌として知られる *Geobacter* や *Citrobacter* の近縁種の生育が確認された。このうち *Citrobacter* の近縁種を単離し、電気化学セルに植菌したところ、植菌に伴う電流生成が確認され、単離株が発電菌であることが確かめられた。今後はこれら単離株の菌の生理学的解析やゲノム解析を行うとともに、EPCを利用して様々な環境から新奇発電菌の単離を行っていきたい。

Song-Ih Han¹, Kyung-Sook Whang^{1, 2}¹Department of Microbial & Nano Materials, College of Science & Technology, Mokwon University, ²Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University

The phylum *Acidobacteria* constitutes one of the most abundant and broadly distributed groups of bacteria in soil ecosystems but is relatively difficult to cultivate and poorly represented in culture. Among the 26 class of phylum *Acidobacteria*, only 5 class were purified and identified. This investigation evaluates the populations of *Acidobacteria* in an acid forest soil by 454-pyrosequencing, and begin to cultivate *Acidobacteria* with adjustments to media and incubation conditions. About 30% of bacterial populations in a Pine forest soil were *Acidobacteria*. They were comprised of 5 subdivisions, Gp1 (52%) and Gp2 (33.5%) class were dominantly distributed. Acidobacterial populations in a Quercus forest soil were classified into 19 subdivisions, we found that Gp4 (23%), Gp6 (21.3%) and Gp16 (13.4%) were the most common. In contrast, only 5% of *Acidobacteria* distributed in a Bamboo forest soil, Gp1 (97%) class was the most abundant. Fourteen *Acidobacteria* were isolated by using diluted NB agar with 6 mM CaCl₂ medium and 12 weeks of long-term incubation. Three isolates grew initially but could not be sustained. Three isolates belong to the GP1 were obtained in this study. On the basis of polyphasic analysis conducted, strain DRP-35 represents a novel species of the genus *Terriglobus*, for which the name *Terriglobus tenax* sp. nov. is proposed. The type strain is DRP-35^T.

酒井 博之¹, 黒沢 則夫^{1, 2}¹創価大学大学院工学研究科環境共生工学専攻, ²創価大学理工学部共生創造理工学科

Sulfolobus 属は、1972年にBrockらにより分離・記載が行われた最初の好酸性、高度好熱性のアーキアである。これまでに下記5種が正式記載されている；*S. acidocaldarius*, *S. metallicus*, *S. solfataricus*, *S. shibatae*, *S. tokodaii*。一方、本属が帰属する *Sulfolobaceae* 科で、全ての記載種を含めて進化系統樹を作製すると *Sulfolobus* 属の5種を結ぶ枝と枝の間には複数の異なる属が混在してしまうという分類学的な問題がある。この系統樹に基づく、基準種である *S. acidocaldarius* の最近縁種は *Stygiolobus* 属のアーキアとなる。この事から我々は、*S. acidocaldarius* 以外の上記4種に対して *Sulfolobus* 属以外の属名を与えるべきだと考えている。一昨年、我々は箱根大涌谷から *S. solfataricus* と *S. shibatae* に近縁な新規アーキアHS-3株を分離する事に成功した(16S rRNA相同性：96.1~96.3%)。本研究では、HS-3株、*S. solfataricus* および *S. shibatae* を *Sulfolobaceae* 科の新属として再提案する事を目的として、HS-3株の分類学的解析を行った。試験項目として、形態学的観察、生育pH・温度範囲の決定、炭素源利用試験、独立栄養性試験、嫌気性試験、16S・23S rRNA遺伝子に基づく進化系統学的解析を行った。HS-3株の細胞形態は球菌(0.8~2.2 μ m)、生育pH範囲はpH 1.5~6.0 (至適3.0)、生育温度範囲は65~93°C (至適85°C)であった。炭素源として酵母エキスやトリプトンなどの複合基質、キシロースやラクトースなどを含めた少なくとも10種類の糖を利用可能であった。独立栄養的・嫌気的条件下での増殖は認められなかった。HS-4株、*S. solfataricus* および *S. shibatae* は、*S. acidocaldarius* と比べて生育温度が5~10°C高く、より多くの糖を利用可能である。16S・23S rRNA遺伝子に基づく進化系統学系統学的解析からも、*S. acidocaldarius* とは系統が異なる事がはっきりと示された。今後は化学分類学的解析やGC含量の決定など、記載と再分類に必用なその他の解析を行っていく予定である。

ワン チョンメイ, ティ ウ, 酒井 康輝, 阿部 敬悦, 横田 明, 矢部 修平
東北大院・農

【背景及び目的】 クテドノバクテリア（綱）は2006年に初めて創設された現在2目3科3属6種から成る知見の乏しい系統であり1種を除いてすべて好熱性である。この分類群は共通して放線菌様の複雑な形態分化を示し、ランチペプチドなどの二次代謝物生合成遺伝子群を21個持つ系統が存在する。その数は創薬微生物と呼ばれる放線菌 *Streptomyces* 属に匹敵する。当研究室では、この分類群が放線菌と並ぶ有益な微生物資源に成り得ると期待して探索を続けており、これまでに本綱に属する好熱性58株、中温性18株を単離し保有している。本研究は、その中から群馬県湯ノ丸高原から分離した未分類の中温性分離株を系統分類する事を目的とした。【結果】 それら未分類の中温性の16株を分子系統解析した結果、*Ktedonobacterales* 目のクラスター内に4つのクレードを形成した。各クレードから任意に選抜したUno3, Uno11, Uno16, Uno17株は最近縁のS-27株（現在、*Ktedonobacteraceae* 科の新属・新種として提唱中1）との相同性が91.3, 96.4, 95.5, 95.0%であり、各々種あるいは属レベルで区別できる事が強く示唆された。これら4株は既報株と同様菌糸を形成し、コロニーの色は白やピンク、橙色と多様であり、生育速度も大きく異なった。それらの化学分類学的試験結果も併せて報告する。1) Yabe, S., et al., IJSEM, 2017 (in press)

鄭 宇, 王 瓊溪, 酒井 康輝, 阿部 敬悦, 横田 明, 矢部 修平
東北大院・農

【背景・目的】クテドノバクテリア (綱) は *Chloroflex* 門に分類されるが、分岐菌糸を形成するなど典型的な放線菌様の複雑な形態を示す事が知られている。また演者らは本綱の代表株である *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 株は好熱菌としては珍しく多くの二次代謝物生合成遺伝子群を持ち、抗菌ペプチドを生産することを見出した。これらの特徴は多様な生理活性物質の有益な探索源と成り得る事を示している。一方で、現在本綱は僅か6種から成り、開拓の余地が大きい。従って本研究では、新規好熱性クテドノバクテリア株を探索し、新規株の系統分類を行う事を目的とした。【方法・結果】1/10濃度のR2Aゲランガム培地を用いて、宮城県鬼首温泉地熱地帯から採取した土壌サンプルを直接接種し、65°Cにて1週間培養した。顕微鏡で分離株の形態を観察し、分岐菌糸にグレープのような孢子を出芽するクテドノバクテリア様コロニーを単離し、分離株13株の分子系統解析を行った結果、*Thermogemmatisporaceae*科に属する3つのクレードに明確に分かれた。各クレードからA1-2, A3-1, A3-2, A3-3株を任意に選抜した。クレード1 (A1-2株) は既報の *Thermogemmatispora* 属との相同性は97%であり、種として区別できると示唆された。クレード2 (A3-1, 3-2株) とクレード3 (A3-3株) は既報の株との相同性は94%, 96%程度と低く、種あるいは属として区別され得ることが分かった。これらの株の化学分類学的試験を実施した結果、主要な脂肪酸はiso-C18:0, iso-C19:0, 12,18-dimethyl18:0、主要なリン脂質はPI, PG, DPG、細胞壁アミノ酸はOrn, Gly, Glu, Ser, Ala, β -Alaであり、その他分類学的試験結果も併せて報告する。

Sujin Kim¹, Jae-Chan Lee², Song-Ih Han¹, Kyung-Sook Whang^{1, 2}¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, ²Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University

We cultured a collection of 80 halophilic isolates from solar saltern by using MA medium. Among these halophilic isolates, 53 halophiles belonging to the phylum *Firmicutes* included genus *Bacillus*, *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus* and *Pontibacillus*. We are currently carrying out more detailed phenotypic and phylogenetic characterization of our novel halophilic isolates. A Gram-stain-positive, moderately halophilic bacterium, designated strain TGS-15^T, was found to be a strictly aerobic, non-motile rod which can grow at pH 6.0–10.0 and at salinities of 1–20 % (w/v) NaCl. Strain TGS-15^T belongs to the genus *Halobacillus*, with sequence similarity of 98.5–96.0 % to known type strains. The major polar lipids were PG, DPG and PE. The cell wall peptidoglycan was found to be based on L-Orn-D-Asp, the predominant isoprenoid quinone was MK-7 and the major fatty acids were identified as anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0}. The DNA G+C content of this novel isolate was determined to be 45.3 mol %. Levels of DNA-DNA relatedness between strain TGS-15^T and the type strains of 13 other species of the genus ranged from 52 to 9 %. On the basis of the polyphasic analysis conducted in this study, strain TGS-15^T is concluded to represent a novel species of the genus *Halobacillus*, for which the name *Halobacillus salicampi* sp. nov. is proposed. The type strain is TGS-15^T.

Seung-Yeol Shin¹, Hyo-Jin Lee², Kyung-Sook Whang^{1, 2}

¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, ²Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University

Only 60% of the isolates from phases III and IV of CFCs were able to grow when subcultured. The '**temporarily culturable**', i.e. those that grew initially but could not be sustained in culture. The 16S rRNA gene sequences of 113 temporarily culturable bacteria, revealed that the isolates comprise six major groups: *Proteobacteria* α - (59 strains); β - (3 strains); γ - (4 strains) subdivisions, *Actinobacteria* (25 strains), *Firmicutes* (11 strains), and *Acidobacteria* (11 strains). We cultured a collection of 8 isolates from soil by using soil extract solid medium, some isolates belonged phylogenetically novel bacteria. A novel bacterium, designated strain ASL46^T was isolated from litter layer of pine forest. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequence showed that strain ASL46^T belongs to the genus *Paenibacillus* and closely related with *Paenibacillus yonginensis* DCY84^T (98.3 %), *Paenibacillus physcomitrella* XB^T (97.4 %). The major isoprenoid quinone was MK-7, predominant fatty acids were anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} and iso-C_{16:0}. The major polar lipids were DPG, PG and PE. The whole-cell sugar was found to be ribose and cell-wall peptidoglycan contained *meso*-DAP. On the basis of the results, strain ASL46^T represents a novel species of the genus *Paenibacillus*, for which the name *Paenibacillus pinistramenti* sp. nov. is proposed. The type strain is ASL46^T (= KACC 18701^T = NBRC 111876^T).

坂本 光央^{1, 2}, 飯野 隆夫¹, 大熊 盛也¹¹理研 BRC-JCM, ²日本医療研究開発機構, PRIME

【目的】 近年の次世代シーケンサーを用いたメタゲノムのアプローチにより、培養を介さずにヒト腸内の微生物叢の把握およびその機能を容易に理解できるようになってきた。しかし、メタゲノムのアプローチにより検出されたヒト腸内の微生物の多くがこれまでに未培養あるいは未同定の微生物（難培養微生物）である。ヒト常在微生物の研究をこれまで以上に発展させるためには、難培養性の微生物を種毎に分離培養し、微生物の本質を理解することが重要である。また、単離された微生物の分類学的研究を行い、その微生物に学名を与え、研究者間でその標的とする微生物に制限なくアクセスできる環境が必要である。本研究では、ヒト腸内から難培養性の微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行うことを目的とした。【方法】 健康成人5名の糞便から種々の血液寒天培地などを用いて菌株を分離した。また、メンブランフィルター法（Tanaka & Benno, Microbiol. Immunol., 2015）の適用も試みた。分離された菌株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。【結果】 *Bacteroides*属や*Bifidobacterium*属に属する菌種も数多く分離されたが、近年、宿主との健康の関連性について注目されている*Akkermansia muciniphila*のような既知種ではあるがユニークな菌種も分離された。該当菌株は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）に寄託し、バイオリソースの整備を行った。また、16S rRNA遺伝子配列の類似度の比較から新菌種であると考えられる菌株も分離された。新菌種候補の中で中心がくぼんだ特徴的なコロニー形態を示す菌株2株は、16S rRNA遺伝子および*hsp60*遺伝子配列の解析結果、主要な菌体脂肪酸などから既知種とは異なっていることが明らかとなり、これら分離株を新属・新菌種*Faecalimonas umbilicata*として命名提案した（1）。本研究は公益財団法人発酵研究所（IFO）の平成27年度一般研究助成およびまたその一部は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が実施する革新的先端研究開発支援事業（PRIME）の支援によって行われた。（1）Sakamoto *et al.* (2017) Int J Syst Evol Microbiol. 67: doi: 10.1099/ijsem.0.001790.

渡邊 美穂^{1, 2}, 小島 久弥¹, 福井 学¹¹北海道大学低温科学研究所, ²日本学術振興会特別研究員PD

*Bacteroides*門はグラム陰性桿菌の巨大な系統群である。*Bacteroides*門の細菌はおもに有機物の発酵分解を行うことが知られているが、中には窒素固定、硝酸還元などを行うものもいることがわかっている。この系統の細菌は環境中に広く分布することが知られており、様々な水圏環境においても比較的高い存在量を示すことが示されてきた。本研究の目的は、ダム湖に由来し*Bacteroides*門*Prolixibacter*科に属する新規淡水性細菌MeG22株の系統学的・生理生化学的特徴づけを行うことである。MeG22株は、ダム湖の湖水を接種源とした嫌気条件下の集積培養系より得られた。アガーシェイク法を2度繰り返すことによってMeG22株の純粋培養を得た。16S rRNA遺伝子全長塩基配列の解析の結果、MeG22株は*Bacteroides*門*Prolixibacter*科の細菌*Sunxiuquinia faeciviva*に91%の配列相同性を有していた。MeG22株とその近縁な環境配列の一群は、*Prolixibacter*科に属するが独立した系統群を形成した。本株の細胞は桿状であり、単独または対で存在していて弱い運動性を有していた。MeG22株は通性嫌気性であり、嫌気条件下では糖を用いて増殖することができた。好気条件下での増殖試験の結果、MeG22株は4-35℃の範囲で増殖し、至適温度は30℃であることがわかった。最適NaCl濃度は0%であり、0.1%のNaCl濃度では細胞はわずかに増殖するものの生育が著しく阻害された。この点は同科に属する他細菌種（最適NaCl濃度は0.5-5%）と比べて大きく異なる特徴であった。以上の結果から、MeG22株は*Prolixibacter*科における新属新種を代表しうる細菌であることが示された。

JUAN LI¹, 殿内 暁夫²¹岩手連大, ²弘前大・農

1993年に一部が世界自然遺産に登録された白神山地は、人為的影響をほとんど受けていない世界最大規模の原生的なブナ林が分布している。我々は2012年から白神山地の樹木に生息する細菌の研究を進めており、樹皮表面から新規性の高い種々の細菌の分離に成功している。本研究ではブナ樹皮から分離された*Armatimonadetes*門に所属する細菌株AX-7について詳細に解析したので報告する。AX-7株は非運動性のグラム染色陰性卵型細胞（1.0～1.2×1.2～3 μm）であり、繊毛を有する。16S rRNA塩基配列に基づく最近縁種*Armatimonas rosea* YO-36^Tとの相同性は87.5%であり、少なくとも科レベルで新規であることが予想された。AX-7株の増殖は1/10R2Aなどの低栄養培地で良好であった。生育pH範囲はpH5.0～7.0（至適pH6.0）であり、分離源であるブナ樹皮のpH（約5.0）に生理的に適応している可能性が示された。植物由来の糖質であるペクチン、キシラン、マンノース、セロビオース、キシロース、ツラノースの利用性が良好であった。AX-7株は多量の粘質細胞外多糖類を生成することから、自身の生産する多糖による樹皮への附着が考えられた。興味深いことに大きな莢膜用構造に2または3つの細胞が包まれている様子が観察された。本研究の結果に基づき、AX-7株を*Armatimonadetes*門の新種として提案する予定である。

In-Hwa Jeon¹, Song-Ih Han², Kyung-Sook Whang^{1, 2}¹Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, ²Department of Microbial & Nano materials, Mokwon University

Colony forming curves (CFCs) show the slow growers are much more numerous than the fast growers and that most of these isolates are sensitive to rich medium confirming their oligotrophic physiology. Slow growing oligotrophic isolates were severely suppressed by mineral salts and organic compounds. A novel genera, designated strain PKR-39^T, was isolated on a low nutrient medium from ginseng rhizosphere soil, and its growth was severely suppressed by less than 0.3% NaCl. A phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that strain PKR-39^T was affiliated with an uncultivated lineage within the *Alphaproteobacteria* and the nearest cultivated neighbours were bacteria in the genera in the family *Methylocystaceae* (92.5–93.8 %) and the family *Beijerinckiaceae* (92.7–93.5 %) in the order *Rhizobiales*. Cells of strain PKR-39^T were Gram-stain-negative, aerobic, non-motile, non-spore-forming rods. The strain contained the ubiquinone Q-10 and cellular fatty acids C_{18:1} ω 7c, C_{18:0}, C_{19:0} cyclo ω 8c as predominant components. The major polar lipids were composed of DPG, PC, PE and PG. The DNA G+C content was 62.3 mol%. On the basis of the information described above, the new genus and species, *Panacibacter rhizosphaerae* gen. nov., sp. nov. is proposed for strain PKR-39^T in the order *Rhizobiales*. The type strain is PKR-39^T (=KACC 17632^T=NBRC 109815^T).

横田 明^{1,2}, 謝 承暉¹, 酒井 康輝², 矢部 修平², 平林 よしの³, 羽生 真樹³, 眞板 寛子⁴, 王 明卓⁴, 佐伯 和彦³, 佐藤 修正⁴
¹東京大学・分生研, ²東北大・院農, ³奈良女子大・理, ⁴東北大・院生命

[目的] 従来、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根粒菌は *Mesorhizobium loti* および *Mesorhizobium japonicum* とされてきたが、演者らは千葉県鴨川市吉浦海岸に生育のミヤコグサから *Aminobacter* に属するものと考えられる2株 (Y103A, Ka9123) を分離した。本研究はこれらの2株の分類学的位置を明らかにすることを目的とする。[方法] 細胞形態はネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。分離株の根粒形成能は、無窒素培地にミヤコグサの種子を接種し、同時にそれぞれの菌株を接種することにより行った。生理・生化学的性質はAPI 20E, API 50CH, API ZYM を用いて調べた。キノン分析はHPLCで行い、菌体脂肪酸組成はMIDIの方法でメチル化し、ガスクロマトグラフィーで分析した。DNA G+C含量の測定はHPLC法で行い、DNA-DNA 相同性試験はフォトバイオチン-マイクロプレート法により行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析はPCR増幅産物をシーケンス後、CLUSTAL Xを用いて多重アライメントを行い、Nighbour-Joining 法により系統樹を作成した。[結果と考察] 分離株Y103A, Ka9123は運動性を有するグラム陰性桿菌であった。系統解析の結果、両株は *Mesorhizobium* 属とは離れ、非根粒菌の属である *Aminobacter* 属のクラスターに含まれた。ミヤコグサの種子への接種試験の結果、Y103A, Ka9123 株には根粒形成がみられ、また無窒素培地での生育を可能としていることから窒素固定も行っていることが判明した。*Aminobacter* 属の全菌種 (*A. aminovorans*, *A. aganoensis*, *A. niigataensis*, *A. lissarensis*, *A. ciceronei*, *A. anthyllidis*) および近縁の菌種 *Carbophilus carboxidus* とDNA-DNA hybridization 実験を行った結果、何れの種ともDNA相同性が60%以下であったことから、別種と判断された。生理・生化学的性状の結果と合わせ、Y103A, Ka9123 株は *Aminobacter* 属の新種と結論され、両株に *Aminobacter nodulans* sp. nov. と命名した。なお、*Carbophilus carboxidus* は *Aminobacter* 属に含まれる菌種であり、DNA-DNA hybridization 実験および生理・生化学的試験の結果に基づき、*Aminobacter carboxidus* comb. nov. とすることを提案する。

Akiko Ebihara¹, Yong Guo², Takashi Kamijo³, Tomoyasu Nishizawa², Hiroyuki Ohta²

¹Graduate School of Agriculture, Ibaraki University, ²Ibaraki University College of Agriculture, ³Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba

Mt. Oyama in the Island of Miyake (Miyake-jima) erupted in 2000 and ejected a large amount of volcanic ash and gases. The site near the summit of Mt. Oyama (site OY) showed no sign of revegetation for nearly 10 years after the eruption, while a mountainside forest (site IG7) was less damaged. Few years afterward, a pioneer plant, *Miscanthus condensatus*, gradually covered the site OY deposit although the total nitrogen content of the volcanic deposit was still as low as around 0.01%. Our prior study in 2016 revealed that the *M. condensatus* rhizosphere possessed measurable levels of acetylene-reducing activity (0.14-2.79 nmol C₂H₄ formed/h/g dw), which was higher for those sampled in September than those in May. Bacteria were recovered on a nitrogen-free medium from the rhizosphere samples and 101 isolates were characterized phylogenetically by analyzing their 16S r RNA genes. *Burkholderia* spp. and *Paraburkholderia* spp. accounted for 62% and 14%, respectively, of the site OY isolates. This was contrast to the predominance of *Pseudomonas* spp. (45%) and the lower incidence of *Burkholderia* group (22%) in the site IG 7 deposit. From these results, it may be assumed that *Burkholderia* group is an early colonizer of the pioneer plant roots.

塩月寧¹, 玉田 祐里佳², 新井 大輔³, 飯塚 禎明³, 村上 匠⁴, 本郷 裕一⁴, 服部 聡^{1, 2}
¹山形大・院農, ²山形大・農, ³山形大・農FSC, ⁴東工大・生命理工

【目的】 土壌中には非常に様々な微生物が生息しており、特に植物の根圏土壌でその多様性が高いことが知られている。一方で、植物内部に生息する植物内生細菌の存在が報告されてきており、植物病原菌に対し抗菌活性を持つもの等、植物の生育促進に寄与するものの存在も明らかとなってきた。しかし、植物内生細菌の中でも放線菌についての知見は未だ多くない。そこで本研究では、草本植物2種と木本植物1種の計3種を用いて、植物内生放線菌の多様性評価を行った。【方法】 庄内朝日山地にて3種の野生植物を採取し、これらの根を試料とした。土壌等、外部環境由来の微生物の混入を防ぐため、無菌環境下において滅菌蒸留水で洗浄し、70%エタノールや1%次亜塩素酸ナトリウムを用いて根の表面殺菌を行った。表面殺菌後の根は固体培地に擦り付けることで根表面由来のコンタミネーションの有無を確認した。その後、液体窒素で試料を破碎しDNA抽出を行い、Illumina MiSeqにより16S rRNA遺伝子 (V4領域) の塩基配列を決定した。ミトコンドリア及び葉緑体由来と推定される配列を除外し、網羅的細菌叢解析を行った。【結果及び考察】 3種の植物に共通して*Proteobacteria*門が優占しており、次いで*Firmicutes*門や*Tenericutes*門に所属する細菌群が検出された。一方*Actinobacteria*門 (放線菌門) では3~5%と、細菌叢全体に占める割合はわずかであった。しかし、放線菌門内に着目すると、各植物種間で菌叢に差異が見られた。また網レベルでは*Acidimicrobiia*綱や*Thermoleophilii*綱、*Actinobacteria*綱に所属する放線菌が検出され、特に*Acidimicrobiia*綱や*Thermoleophilii*綱の稀少放線菌では新規性の高い配列が検出されたことから、今回の試料に用いた3種の植物は新規放線菌の有用な分離源となる可能性が示唆された。

小林 ほなみ¹, 堀 翔太², 羽田 来瑠美¹, 村上 匠³, 本郷 裕一³, 服部 聡^{1, 2}

¹山形大・農, ²山形大・院農, ³東工大・生命理工

【目的】 放線菌は各種生理活性物質を生産する有用細菌として知られ、多種多様な放線菌が土壌から分離されている。一方近年、海洋域に生息する放線菌として海藻由来のものも着目されてきている。しかし、これらの知見は土壌のものとは比べて未だ少ない。そこで本研究では、様々な海藻に由来する放線菌の多様性評価を行った。【方法】 山形県飛島沿岸から複数の海藻種（褐藻類・紅藻類・緑藻類）を採取し、これらを試料とした。海藻試料は海水由来の微生物の混入を防ぐため、滅菌した人工海水で洗浄を行った。その後、液体窒素存在下で試料からDNAを抽出し、Illumina MiSeqを用いて海藻種ごとに16S rRNA遺伝子V4領域の塩基配列を取得した。ミトコンドリアと葉緑体由来と推定される配列を除外後、網羅的細菌叢解析を行った。【結果及び考察】 門レベルでは、いずれの海藻種においても*Proteobacteria*門、*Bacteroidetes*門が主要な細菌群として検出された。このうち、放線菌門の占める割合は0.04～3%と少なかった。一方、放線菌門の内訳としては、海藻の種類を問わず*Acidimicrobiia*綱がほとんどを占めており、科レベルの未培養のグループ（OTU）から構成されていた。また、これらのOTUの割合は海藻種によって異なっていた。以上から、海藻は*Acidimicrobiia*綱に属する新規放線菌の分離源として有用である可能性が考えられた。

浜田 盛之, 齊藤 里美, 柴田 千代, 田村 朋彦
製品評価技術基盤機構・NBRC

【目的】海洋環境は未知微生物の探索源として注目されており、特に海洋由来の放線菌は新規生理活性物質の探索源としての有用性が数多く報告されている。本研究では、分類学的新規性の高い放線菌の取得を目的として海岸環境由来試料から菌糸状の形態を示さない放線菌（アクチノバクテリア）の分離を試みた。また、得られた分離株のうち、マングローブ干潟土壌から分離したHls16-32株が16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析によって分類学的新規性が高いことが示唆されたため、多相分類学的手法を用いて本株の分類学的位置を明らかにした。【方法および結果】石垣島および西表島の海岸およびマングローブ域を中心にサンプリングを行い、5% NaClおよび抗生物質を添加した5倍希釈NBRC 802培地を用いた希釈平板法によりアクチノバクテリアの分離を行った。20試料から170株を分離し、各株の細胞抽出物をMALDI-TOF MSを用いて分析した。得られたスペクトルの相同性に基づき重複株を除いた後、残った120株について16S rRNA遺伝子塩基配列を決定し、簡易同定を行った。その結果、全分離株の87%にあたる104株がアクチノバクテリアであり、19属にわたる多様な株が得られた。また、新種候補株（16S相同性98.7%未満）は全分離株の18%にあたる22株得られた。16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果、これらの新種候補株のうち、Hls16-32株は*Microbacteriaceae*科に含まれるが、既知のどの属のクラスターにも含まれないことが明らかとなった。本分離株のペプチドグリカン骨格はグルタミン酸、グリシン、リジンを約2:2:1の割合で含んでいたが、驚くべきことにペプチドグリカン骨格の主要構成成分であるはずのアラニンは検出されず、極めて新奇な構造を有していることが推測された。現在詳細なペプチドグリカン構造について解析を進めている。また、主要なメナキノンMK-11、MK-12、MK-10で、主要な脂肪酸はanteiso-C_{15:0}、anteiso-C_{17:0}、iso-C_{15:0}、ゲノムDNAのG+C含量は72.2 mol%だった。これらの化学分類学的特徴の組み合わせは、系統的に近縁などの属とも異なっていた。よって、Hls16-32株を*Microbacteriaceae*科の新属新種*Arenivriga flava*として提唱する。

Hyo-Jin Lee¹, Kyung-Sook Whang^{1, 2}¹Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, ²Department of Microbial & Nano Materials, College of Science & Technology, Mokwon University

We have hitherto isolated a large number of actinobacteria from various environments. Using the low nutrient medium and extended incubation times, we were able to isolate novel members of the *Catenulisporaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptomyetaceae*, *Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* and *Micromonosporaceae* of the phylum *Actinobacteria*. A novel actinobacterium, designated strain UDF-1^T, was isolated from old litter strata in a *Quercus* forest. Strain UDF-1^T formed a branched brownish orange substrate mycelium with spherical or oval spores. Strain UDF-1^T belongs to the genus *Micromonospora*, with sequence similarity of 99.2–98.8 % to known type stains. Phylogenetic analysis based on the *gyrB* gene sequence also clearly showed that the strain UDF-1^T was different from any previously discovered species also of the *Micromonospora*. The cell-wall contained *meso*-diaminopimelic acid and the whole-cell sugars were arabinose and xylose. The polar lipids were DPG, PE and PI. The predominant menaquinones were MK-10 (H₄) and MK-10 (H₆). The major cellular fatty acids were iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0} and iso-C_{15:0}. The genomic DNA G+C content was 73.1 mol%. On the basis of the data presented, strain UDF-1^T is suggested to represent a novel species of the genus *Micromonospora*, for which the name *Micromonospora fulva* sp. nov. is proposed. The type strain is UDF-1^T (= KACC 18696^T = NBRC 111826^T).

Nanami Konuma¹, Yoshinori Sato², Masahide Inuzuka², Masayuki Morii², Nobuaki Kuchitsu², Tomoyasu Nishizawa¹

¹Grad. School of Agri., Ibaraki Univ., ²Tokyo National Research Institute for Cultural Properties

Green epiphytic microorganisms grow on the surfaces of cultural stone monuments due to change in the microclimate conditions by installation of lighting and air conditioning system. Recently, the occurrence of phototrophic microorganisms was observed on the surface of stone coffins of Sekijinsan Tumulus in Fukuoka prefecture, Japan, after trimming of trees in the burial mound to prevent trees fallen. In our previous study, we carried out pyrosequencing analysis to assess cyanobacterial community on the stone monument. The operational taxonomic units (OTUs) closely related to cyanobacteria, nitrogen-fixing *Tolypothrix distorta* and salt-tolerant *Halospirulina*, were detected dominantly. The aim of this study is to identify and characterize epiphytic cyanobacterial isolates on the stone monument. Samples were collected from the stone surfaces and cultured in liquid CB medium. A rod-shaped cyanobacteria was obtained by means of the pour plate method, and then cyanobacterial 16S rRNA gene was determined. Although 16S rRNA based-phylogenetic analysis and blast search showed that closely related to OTU was the genus *Halospirulina* (80% identity), these strains were different from a morphological feature of the genus *Halospirulina*. Our results suggested that novel cyanobacterial strain occurred on the arid stone surface because of the microclimate change.

清水 由巳, 紺野 裕介, 富田 遥介, 都築 勇亮
関東学院大・理工

脂質分解酵素リパーゼは、反応条件に応じて広範囲のエステルを合成、または分解する。このため、リパーゼは、食品素材の製造、化粧品添加物、消化酵素剤などの医薬品、排水処理など様々な分野で使用され、さらなる利用が期待されている。このような背景から、我々は酵素の生産性や特異性の観点から供給源として有効な微生物に着目し、細胞外分泌酵素を多く生産する真菌を用いて、脂質分解をする酵母の探索を試みた。利尻産酵母 171 株を使用した。リパーゼ活性を有する菌株のスクリーニングは、Rhodamine B 培地による検出法を用いた。Rhodamine B 培地での炭素源として、オリーブオイル、菜種油、魚油、ラード、Triolein等を用いた。リパーゼ活性を有すると期待される菌株について、TLC による Triolein の分解生成物の検出を行った。溶出溶媒には石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 (70:30:1,v/v) を使用した。遺伝子配列による系統解析には、リボゾーム rDNA の D1/D2 領域、Elongation factor1- α (EF1- α) の DNA 塩基配列を用いた。遺伝子配列による系統解析の結果、未記載種であると予想された 2 株については、近縁の *Wickerhamomyces alni* の基準株 NBRC 10710^T を含め、生理学的性状試験を行った。これらの結果、利尻産酵母 171 株のうち 39 株は、炭素源がオリーブオイルである Rhodamine B 培地で陽性であった。これらのうち 5 株は炭素源を菜種油、あるいは Triolein としても Rhodamine B 培地で陽性であり、かつ 4°C での培養でも陽性であった。これら 4 株について D1/D2 領域、EF1- α の DNA 塩基配列を用いた系統解析の結果、2 株は 1 つのクラスターを形成し、かつ既知の配列との一致はみられなかった。生理生化学的性状試験の結果、グルコースを発酵し、炭素源資化性試験において 4 つの炭素源で *W. alni* と違いがあった。これら 2 株は同種であり新種である可能性が示唆された。また、これら 2 株について TLC により Triolein の分解生成物と思われる物質を検出できた。これらのことから、2 株は低温でも活性のある脂質分解酵素を産生する未記載種であることが期待された。

森谷 千星, 門倉 利守, 数岡 孝幸, 中山 俊一, 竹田 正久, 田中 尚人, 鈴木 健一朗
東農大・醸造

【目的】清酒、焼酎、泡盛等から分離された国酒酵母(清酒酵母 *S. sake*、焼酎酵母、泡盛酵母 *S. awamori*)は、The Yeasts 5thにおいて *Saccharomyces cerevisiae* に分類されている。しかし、国酒酵母は生理学、生化学的性質において *S. cerevisiae* とは異なる性質を多く持ち、特異な一群を形成している。更に、国酒酵母の中にもそれぞれ特徴があり、実用的な優良株と醸造過程で分離された野生株でも、異なる性質を持つことが示唆されている。しかし、国酒酵母はカルチャーコレクション等では *S. cerevisiae* とされており、国酒醸造において有用菌株を選択することは困難である。そこで本報告では、国酒酵母の実用株、野生株に加えて、本学菌株保存室(NRIC)をはじめとした他の保存機関に保存されている国酒関連の菌株を用いて、The Yeasts 5th のKey to speciesと研究室独自の分類指標を試験し、分離源や醸造環境、学名の変遷等の異なる要素を考慮しながら、国酒酵母の特性について検討した。【方法及び結果】清酒酵母25株(協会清酒酵母11株)、焼酎酵母31株(1964年竹田分離株28株)、泡盛酵母16株(1964年竹田分離株13株)と、NRICの国酒関連の菌株19株、大阪大学OUTの泡盛酵母1株を用いた。また、対照として *Saccharomyces* 属の7種に加えて *S. arboricolus*、*S. pastorianus* の祖先種と考えられている *S. eubayanus* も用いた。The Yeast 5th のKey to speciesの7項目と、独自の分類指標である微量成分の要求性、糖類資化性等の生理学的試験、細胞タンパクによる生化学的試験、特定遺伝子による分子系統学的試験等を行った。清酒酵母は、きょうかい7号を代表として汎用されている協会清酒酵母と、*S. sake* とされたIFO 0304を含む一群に分けられた。焼酎及び泡盛由来の酵母は、球磨焼酎からの分離株SH-4、1981年に分離の泡盛1号酵母と焼酎より分離され *S. batatae* とされた株を含む一群、甘藷もろみから分離の宮崎酵母を含む一群、泡盛もろみから分離の鹿児島酵母と *S. awamori* とされた株を含む一群、及び焼酎由来の野生株に分けられた。鹿児島酵母と *S. awamori* の一群は、*S. sake* とされた一群と同じ性質を示した。これらから、国酒酵母は概ね3~5群に分かれ、*S. cerevisiae* とは異なる特性を有し、分離当時の先人による性質や学名を反映することが示唆された。

柴山 洋翔¹, 乙黒 美彩¹, 中島 千晴², 安藤 勝彦³, Nyunt Phay⁴, 早川 正幸⁵, 柳田 藤寿¹¹山梨大院・生命環境, ²三重大院・生物資源, ³NBRC, ⁴パテイン大, ⁵山梨大

ミャンマー連邦は国土の大半が熱帯や亜熱帯に位置し、高い生物多様性を有することが知られる。したがって微生物もその多様性が高いと期待され、分類学的研究の対象として大変魅力的な国である。ミャンマーの植物相は日本とは大きく異なり、熱帯域特有の植物が多く存在する。本研究では日本とミャンマーに自生する多様な植物の花から酵母を取得し、その多様性、種構成、分布の違いを比較、評価することを目的とした。

花の採集はミャンマーにて2016年11月～12月に24サンプルを、日本では三重県津市において2015年2月～7月に23サンプルを採集した。酵母の分離は滅菌水中に花を入れて激しく攪拌し、メンブランフィルターでろ過後、花とフィルターをそれぞれYM培地上に静置した。培養は25℃、3日間行い、出現したコロニーを単離した。ミャンマー産サンプルから36株、日本産サンプルからは322株を分離した。日本産酵母分離株については、コロニー観察より90株を選抜、ミャンマー産分離株36株と合わせ解析の対象とした。分離株の同定と多様性は26S rRNAコード遺伝子のD1/D2領域の塩基配列を用いて、BLAST検索及び分子系統解析により行った。ミャンマー産分離株36株は10属14種と多様な分類群から構成され、そのうち担子菌酵母である *Papiliotrema* 属が9株と最も多く、その全てが *Papiliotrema laurentii* であった。また36株のうち、2株は既知種とのD1/D2領域塩基配列の相同性が98%未満であり新種と推定された。一方、日本産分離株90株は11属17種に分類された。子囊菌酵母の *Candida* 属 (56株)、 *Metschnikowia* 属 (12株) が多く分離され、種ランクでは、 *Candida rancensis* の分離頻度が55株と最も高かった。90株のうち、15株6種がD1/D2領域塩基配列の相同性から新種と推定された。ミャンマー、日本ともに花には多様な酵母が棲息していることが示唆され、ミャンマーと日本で共通して分離された属は、子囊菌酵母では6属中3属、担子菌酵母では7属中5属であった。一方、共通して分離された種は *Pseudozyma hubeiensis* 1種のみであった。すなわち、ミャンマーと日本の花に棲息する酵母相は属レベルでは共通性が高いが、種構成は異なり、多くの未記載種が存在することが示唆された。

出川 洋介¹, 平尾 章¹, 佐藤 幸恵¹, 山田 宗樹¹, 恩田 義彦², 遠藤 力也³, 大熊 盛也³
¹筑波大・MSC菅平, ²理研・CSRS, ³理研・BRC

筑波大学生物学類の「モデル生物多様性実習」では酵母、ショウジョウバエなどモデル生物の近縁種を野外で探索し生物多様性を理解することを目的としているが、花蜜酵母は訪花昆虫とも関わり、植物・動物・菌類3者の相互作用を考える上でも良い材料である。2016年9月の実習で、花蜜基質から複数の酵母を得たが、うち11株がLSU rRNA遺伝子のD1/D2およびITS領域の塩基配列の相同性検索、形態観察から *Metschnikowia* 属と同定され、以下の3種に分類された。また、希釈V8培地を用いた定法で子嚢の誘導を試みたが形成されなかった。試行錯誤の結果、酵母コロニーへの *Cladosporium* 属等の糸状菌の混在が、誘導に有効と判明し、全3種で子嚢の誘導に成功した。1. *Metschnikowia reukaufii* (ツリフネソウ、ムラサキツメクサ花蜜、ケシキスイ科昆虫歩行培地より計7株) 形態的特徴および、D1/D2領域およびITS領域の塩基配列が既知株とそれぞれ100%および97%の一致を示し本種と同定された。ITS領域については、7株から3つのファイロタイプが検出され、昆虫歩行培地より分離された1株からは他の2ファイロタイプの混合配列が検出された。2. *Metschnikowia* sp. 1 (ヤマオダマキ花蜜より1株) D1/D2領域の塩基配列からは *M. cibodasensis* との類縁性が示唆されたが、エピタイプ株の配列との一致は93%だった。子嚢や酵母細胞の形状も異なり、未記載種と判断されたが、今後、分離株を増やし、詳しく検討する必要がある。3. *Metschnikowia* sp. 2 (トラマルハナバチ蜜胃、キツリフネ花蜜より計3株) 形態的には、*M. lachancei* に類似するが、同種のD1/D2領域の塩基配列との相同性は97%だった。また生理的性状も、D-グルシトールの資化性を有し、10% NaCl含有培地上で生育不能などの点で、同種とは明瞭に区別され、本種は未記載種と判断された。子嚢は成熟時、崩壊し易く、子嚢胞子は発芽して偽菌糸を伸ばし、単相の酵母細胞を生じた。和合性の単相細胞を混合すると数時間以内に接合が起き、培地上で生活環を完遂させることに成功した。ITS領域の配列に関し、3株より計11個のファイロタイプが検出され、ゲノム内変異が示唆された。

Jamjan Meeboon, Susumu Takamatsu
Mie Univ.

Powdery mildews are obligate plant pathogenic fungi affecting a wide range of angiosperm plants, and easily recognized by their appearances on the host surface as patches of mostly white to grayish, like talcs. Powdery mildews are mostly described from temperate region of the Northern Hemisphere (e.g. Europe, Russia, and East Asia), but remains unexplored in Africa, North and South America, and Southeast Asia. It is important to study diversity of powdery mildews in these regions. During this study, specimens of powdery mildews were collected from Thailand to identify and examine the diversity of powdery mildews using morphology and molecular phylogeny analyses. Taxonomic study of herbarium specimens of powdery mildews from Japan were also conducted. In this study, 19 new species and 2 new combinations, and 3 new varieties and 1 new synonym were described and illustrated. We also report 11 new host records for powdery mildews in the world. In addition, 98 records of powdery mildews new to Thailand were described.

菱島 綾華¹, 小野 剛², 廣岡 裕吏¹¹法政大植物医科, ²東京小笠原農セ

東京都小笠原諸島のパッションフルーツ (*Passiflora edulis* × *P. edulis* f. *flavicarpa*) の果実および枝から確認された *Diaporthe* 属菌2種の分類学的所属と病原性を検討した。OGC15-11菌株は、2015年6月に東京都小笠原諸島母島で収穫された果実腐敗症状から分離された。罹病果実上に形成された本菌の α 胞子は楕円形～紡錘形、2つの油滴を持ち、大きさ $6\sim 10 \times 2\sim 3 \mu\text{m}$ 、 γ 胞子は円筒形、複数の油滴を持ち、大きさ $10\sim 15 \times 2\sim 3 \mu\text{m}$ であった。以上に加え、rDNA-ITS, *HIS*, *TUB*, *EF1- α* および*CAL*領域を用いた分子系統解析の結果、本菌は*D. endophytica* と近縁であるが単独のクレードを形成したため、未知種と判断した。HM16-288C菌株は、2016年7月に東京都小笠原諸島父島の成木の枝枯れ症状から分離された。罹病枝上に形成された本菌の α 胞子は楕円形～紡錘形、複数の油滴を持ち、大きさ $6\sim 9 \times 2\sim 4 \mu\text{m}$ であった。果実分離菌と同様、5つの遺伝子領域を用いた系統樹を作製したところ、*D. pseudomangiferae*と*D. perseae*に極めて近縁であった。そこで今回は、これらの形態的特徴および系統解析の結果を考慮し、*Diaporthe* sp. に留めた。それぞれの分離菌の病原性再現試験を行ったところ、果実腐敗症状から分離されたOGC15-11菌株は、健全な果実に病原性を示したが、枝枯れ症状から分離されたHM16-288C菌株は、健全な枝に病原性を示さなかった。以上の結果より、小笠原産パッションフルーツには少なくとも果実と枝に寄生する2種の*Diaporthe*属菌が存在することが明らかとなった。

細矢/Hosoya 剛/Tsuyoshi¹, “S” Project²¹国立科学博物館, ²Project “S” working group

アラゲコベニチャワントケ*Scutellinia*属は、直径1-30mm程度の小型の子実盤を形成し、赤色の子実層と褐色の棘状の毛を有するのを特徴とするチャワントケ目の子実菌類である。本属菌の日本産の代表的な種はタイプ種でもある*Scutellinia scutellata*で、一般書や図鑑などでも本菌が最も一般的として紹介されている。しかし、本属菌には*S. scutellata*以外にも多数の種が存在しており、日本産の標本の中には図鑑の記載なども*S. scutellata*には合致しない点があるものも多い。そのため、日本産の種についての正確な同定・分類が求められている。本属菌は比較的稀産であるため、材料を収集することが難しい。一方、本菌はヨーロッパでは比較的広く分布し、多数の種についてのDNAバーコード領域（ITS-5.8S）が解析されている。そこで、材料を短期に収集し、DNAバーコードをもとにした識別と同定を行い、合わせて日本産の本属菌の分類学的位置を検討するため、17人の市民科学者と協働したプロジェクトProject“S”を立ち上げた。本プロジェクトでは、参加する市民科学者が材料を採集し、国立科学博物館に送付する。国立科学博物館ではこの標本を保存するとともに、バーコード領域を解析し、その結果を共有する。次に、市民科学者と協働でその形態を観察し、一般市民では採取しにくい分子系統学的情報と、形態学的データをもとに、日本産の*Scutellinia*についての知見を蓄積することを目的としている。現在までに収集された、100点以上の標本が解析された。その結果、一般種と思われる*S. scutellata*はむしろ稀であること、従来あまり注目されていなかった*S. citrina*や、*S. colensoi*などのほうがむしろ高頻度で産することなどが判明した。また、ITS-5.8Sのみでの識別は難しく、補助領域が必要であることが示唆された。

松澤 哲宏¹, Olga Mashedi³, 五ノ井 透², Christine Bii³, 堀江 義一²¹長崎県立大, ²千葉大・真菌センター, ³ Medical Mycology Kenya Medical Research Institute, Kenya

ケニアにおいてアフラトキシンによる穀類の汚染は深刻でありヒトの死亡中毒事故も発生している。土壌中に *A. flavus* や *A. parasiticus* などのアフラトキシン産生菌が極めて高頻度で分布するホットスポットがある事も明らかになっている。そのため、これらの地域における農作物の衛生管理は非常に重要な課題となっている。近年、ココアやチョコレート、小麦、ヘーゼルナッツなどでアフラトキシンとオクラトキシンの複合汚染に関する報告がされている。ケニアにおけるオクラトキシン汚染についてはコーヒーや小麦といった代表的な農作物においてのみ調べられており、主食となっている農作物であるトウモロコシにおけるカビ毒の複合汚染に関する研究はほとんど行われていない。ケニアにおいてトウモロコシのオクラトキシン汚染の実態を把握する事は、カビ毒の汚染リスク管理において非常に重要である。

本研究では、アフラトキシン汚染のホットスポットで収穫したトウモロコシから分離された *Aspergillus section Nigri* について、 β -tubulin, calmodulin および RPB2 遺伝子による分子系統解析および形態学的特徴を詳細に検討した。その結果、系統学的および形態学的に既知種とは異なる株が複数認められた。*Aspergillus* sp. 1 ke-26-208株は、分生子は亜球形から広い楕円形で、突起～低いシワ状隆起を有する。それに対して近縁種である *A. noeniger* は球形でトゲ状の分生子を形成する。*Aspergillus* sp. 2 ke-16-260 株は分生子は広い楕円形で、カボチャ型、明瞭な筋状の突起を有する。それに対して近縁種である *A. niger* は球形でトゲ状の分生子を形成する。*Aspergillus* sp. 4 ke-10-42 株の分生子は広い楕円形で、カボチャ型、隆起は明瞭で断裂状、突起状の隆起を有する場合もある。それに対して近縁種である *A. welwitschiae* の分生子は球形～亜球形で縦に明瞭な筋状の隆起を有する。これらの 3 株は分子系統および分生子の形態から新種である可能性いと考えられる。また、これらの株について PCR 法を用いたオクラトキシン合成酵素遺伝子の有無による簡易スクリーニングを試みた結果、これらの 3 種においてはオクラトキシン生合成遺伝子を有していなかった。

安藤 裕萌, 升屋 勇人, 田端 雅進
森林総合研究所東北支所

ウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) は、ウルシ科に属する落葉性の高木で、日本の各地で植栽されている。ウルシから得られる樹液は「漆」と呼ばれ、漆器制作や重要文化財建造物等の修復に用いられる。近年、文化財建造物の修復のために国産漆の需要が高まっているものの、ウルシ植栽地において胴枯病による被害が発生している。本病原菌は、形態的特徴において *Diaporthe* 属の無性世代であると思われるが、種同定には至っていない。そこで本研究は、分子系統解析および形態観察によって本病原菌の分類学的な所属を明らかにすることを目的として研究を行った。北海道、青森県、岩手県のウルシ植栽地において、胴枯病罹病枝を採取し、単分子分離または樹皮からの組織分離によって得られた計10菌株を本研究に供試した。5領域遺伝子 (ITS、calmodulin、histone H3、beta-tubulin、translation elongation factor 1-alpha) に基づく分子系統解析を行った結果、供試菌株は2系統群 (*Diaporthe* sp. Aおよび*Diaporthe* sp. B) に分かれた。*Diaporthe* sp. Aは胴枯病の標徴部に形成された分生子殻からの単分子分離および組織分離によって得られた8菌株で構成され、*Diaporthe* sp. Bは組織分離によって得られた2菌株で構成されたことから、*Diaporthe* sp. Aがウルシ胴枯病の病原菌であると考えられた。*Diaporthe* sp. Aと系統的に近縁であった4種 (*D. impuls*a, *D. ampelina*, *D. fibrosa*, *D. detrusa*) について形態的特徴の比較を行ったところ、 α 分生子の大きさや β 分生子の有無によって形態的にも異なっていた。しかしながら、*Diaporthe* sp. Bについては、培養下においても有性世代および無性世代の形成がみられなかったため、形態的特徴を比較することが出来なかった。本系統群については、今後、さらなる調査が必要である。以上の結果から、*Diaporthe* sp. A系統がウルシ胴枯病菌であり、本種は*Diaporthe*属の1新種であると結論した。本菌の病原力については、接種試験によって現在調査中である。

常盤 俊之¹, 廣岡 裕史², 広瀬 大³, 野中 健一¹, 岡田 元⁴¹北里大・北里生命科学研究, ²法政大・植物医科, ³日大・薬学, ⁴理研・BRC

Sphaerostilbella属菌は子囊菌門ボタntaxケ目ボタntaxケ科 (Hypocreaceae, Hypocreales, Ascomycota) に属し, 主に担子菌多孔菌類に寄生する菌寄生菌である (Rogerson 1970; Rossman et al. 1999). 本属はSaccardo (1905) により属の新組合せが提唱され, その後Seifert (1985) によってGliocladium属のテレオモルフとして整理された. 我が国からは, アナモルフとしてGliocladium penicillioides CordaとG. aurifilum (W.R. Gerard) Seifert et al. が報告されているが, それぞれのテレオモルフは確認されていない. 演者らはG. penicillioidesとG. aurifilumの各々のテレオモルフであるSphaerostilbella aureonitens (Tul. & C. Tul.) Seifert et al. とS. lutea (Henn.) Sacc. & D. Sacc. を本邦よりはじめて採集分離したので, ここに報告する. 引用文献: Rogerson CT (1970) The hypocrean fungi (Ascomycetes, Hypocreales). Mycologia 62: 865–910. Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R (1999) Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Stud Mycol 42: 1–248. Saccardo PA (1905) Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum, vol XVII. Saccardo PA, Padova, pp 778–779. Seifert KA (1985) A monograph of Stilbella and some allied hyphomycetes. Stud Mycol 27: 1–235.

前川 泰輝¹, 宮入 一夫^{2, 3}, 原田 幸雄^{2, 3}, 殿内 暁夫¹¹弘前大・院農, ²弘前大・農, ³白神キノコの会

[背景・目的] 子囊菌門クロサイワイタケ科のクロサイワイタケ属 (*Xylaria*) の子座は腐朽木、土、落葉、果実、種子などの基質から発生する。日本産の *Xylaria* 種としてはホオの果実から発生するホソツクシタケ (*X. magnoliae* J. D. Rogers) やブナの殻斗から発生するブナノホソツクシタケ (*X. carpophila* (Pers.) Fr.) などが知られている。2015年に青森県西目屋村の弘前大学附属白神自然観察園において、サワグルミの堅果からホソツクシタケに形態が類似する子座（サワグルミノホソツクシタケと仮称）が発生しているのが発見された。本菌の形態学的・分子系統学的解析を行ったので報告する。

[方法] サワグルミノホソツクシタケの子座を2016年6月～8月に白神自然観察園等で採取し、分生子座・分生子・子嚢子座・子嚢殻・子嚢・子嚢胞子などを観察し、多孢子分離または組織分離により菌株を分離した。分子系統解析はITS領域と *rpb2* 領域の塩基配列に基づいて行った。

[結果] サワグルミノホソツクシタケは、6月末から7月末の間に分生子座の発生が観察され、その多くは7月末から8月中旬までに子嚢子座に成熟した。子座は分生子座・子嚢子座ともに細い円筒形で先端が尖っていた。分生子座は全体的に白色の分生子で覆われ、分生子は類球形～紡錘形。子嚢子座は黒色で埋生する球形～類球形の子嚢殻を持ち、子嚢頂孔の先端リングはアミロイドであった。子嚢胞子は一方が膨らんだ楕円形で、大きな油球が1つ見られた。ITS領域に基づく分子系統解析により、*X. palmicola* G. Winterが近縁種であるが、塩基配列の類似度が90.9%であり、本菌が新種であることが示された。

以上の結果に基づき、本菌を和名“サワグルミノホソツクシタケ”、学名“*Xylaria pterocaryae*”と命名し記載する予定である。

岡田 元¹, 中島 稔², 渡辺 舞³, 正木 照久⁴, 飯田 敏也¹, 大熊 盛也¹, 出川 洋介⁵

¹理研・BRC, ²神奈川キノコの会, ³神奈川県博（外来研究員）, ⁴大鵬薬品・天然物フロンティア研, ⁵筑波大・山岳科学センター（菅平）

MycosylvaはTulloch (1973) が*M. clarkii*を基準種として設立したいわゆる“不完全菌”で、*M. reticulata* (Samson & Hintikka 1974) と *M. setosa* (Udagawa & Furuya 1982) の3種を含む。本属の塩基配列の登録はなく、系統的位置は不明。属徴は、1) シンネマ（分生子柄束）を天然基質や培地上で形成し、頭頂部は乾性分生子塊を有す；2) 分生子は乾性、単細胞、出芽型（基部で分枝、先端で短く連鎖）など。種の識別は、1) シンネマの柄と分生子塊の色調；2) 頭頂部で分生子形成細胞を支持する稔性菌糸の形態と色調；3) 分生子の表面構造と大きさ；4) 菌株の生育温度などによる。3種のタイプは動物（ネズミや昆虫など）の糞上でシンネマを形成しているもので、タイプ由来株も現存する。これらの株は天然基質と類似したシンネマを培地上で形成する。演者らはMycosylva 3種を採集分離したので報告する。1. *Mycosylva* sp. 1ウサギ(?)の糞（宮崎県宮崎市，1992年9月）より採集（標本・分離株）。天然基質と培地上で紐状・茶色・大型のシンネマを形成し（培地上で長さ5cm以上）、頭頂部に淡褐色の分生子塊を有す。未記載種と思われる。2. *Mycosylva* sp. 2ネズミ(?)の糞（神奈川県横浜市，2017年1月・5月）より採集（標本・分離株）。灰色のシンネマより得た株が形成したシンネマは黒色稔性菌糸を有し、頭頂部がオリーブ色・柄が黒褐色であるため、*M. setosa*と思われた。しかし、天然基質上で共存した未熟なシンネマと思われた黄色子實體から分離した株のコロニーは黄色のままであった（前者は緑色）。後者を長期培養すると亜球形の緩い閉子囊殻、8孢子性球形の子囊、楕円・無色の子囊胞子を形成した。両者の関係を再培養やITS配列により再検討する必要がある。3. *M. reticulata*タヌキの糞（長野県上田市，2012年12月）より分離（分離株）。シンネマはMycosylva sp. 2と類似するが、やや大型、成熟につれて分生子塊が黄色から暗緑色に変化する。分生子は亜球形、粗面（網目構造も確認）。黒色稔性菌糸なし。形態的特徴から*M. reticulata*と同定。今後、タイプ由来株を入手して形態や生育温度を比較検討し、分子系統解析も行う。

宮内 信之助
新潟市・宮内環境研

本州山岳地帯で採取されたフウセンタケ属のきのこについて調べ、2種の日本新産種を確認した。(1) *Cortinarius mellinus* Britz.; 1995年9月23日長野県乗鞍岳6合目針葉樹林内地上、1997年10月6日長野県菅平針葉樹林内地上で採取したきのこについて調べた。子実体の傘は中高の丸山形、比較的滑らかでくすんだ橙黄色、ぬめりがない。また、柄も傘と似た色合い、肉は淡色であるが傘と似た色合いで、特徴的な味はない。胞子は短楕円形であった。これらの特徴からキンチャフウセンタケ亜属のきのここと推定した。きのこの特徴は以下の通りである。傘は径4-6cm、丸山形から平に展開、中央少し突き出る。くすんだ橙黄色、繊維状でわずかに鱗被、粘性はない。味穏和。柄は6-8X0.9-1cm、筒状、はじめ黄色次第に傘と似た色合いとなる。やや淡色、柄の基部に膨らみはない。粘性はなく、上部のベールは若い時消失する。胞子は短楕円形、6-9X5-6.5 μ m。また、こん棒状の縁シスチジアが観察される。やや華奢な全体蜜色系の色合いなどからキンチャフウセンタケ亜属の上記学名を推定した。和名としてミツイロフウセンタケを提案。(2) *Cortinarius crassus* Fr.; 1995年9月23日長野県乗鞍岳6合目針葉樹林内地上、1999年8月26日長野県乗鞍岳6合目針葉樹林内地上で採取したきのこについて調べた。傘表面には細かい鱗被が見られ、柄が白いきのこであった。キンチャフウセンタケ亜属のきのこに近いと考えたが、肉の色の変化はなく、また胞子の形、ひだの縁シスチジア、側シスチジアの形から上記の学名の亜属のきのここと推定した。きのこの特徴は以下の通りである。傘は径5-8cm、丸山形から平らに展開。くすんだ橙黄土色～黄土褐色、繊維状で細かい鱗被、粘性はない。味穏和。柄は6-9X1.2cm、筒状、白色、古くなると汚黄色のしみ。粘性はない。白い綿状のベールが見られる。柄の基部は膨れる。胞子は楕円形～アーモンド形、7-8.5X4-4.5 μ m。また、やや屈曲した特徴的なこん棒状の縁シスチジア、側シスチジアが観察される。全体の色合いと白い柄、また微視的な特徴などからオオカシワギタケ亜属の上記学名を推定した。和名としてシロアシホテイフウセンタケを提案。

浪川 真奈¹, 梨木 之正², 保坂 健太郎³, 糟谷 大河¹
¹千葉科学大・危機管理, ²小松市博, ³国立科博・植物

担子菌門ハラタケ目キシメジ科に属するニセマツタケ *Tricholoma fulvocastaneum* は、マツタケ *T. matsutake* と形態的・系統的に近縁な食用きのこである。本菌は、これまでに日本とタイに分布することが知られており、日本では、本州から南西諸島にかけて分布している。ニセマツタケは本州では8～10月に、南西諸島では11月～12月にかけて、主に腐植層の乏しい広葉樹林内の地上に発生する。本菌は、本州や奄美大島など日本各地で伝統的に食利用されているが、環境省レッドリストでは準絶滅危惧種に指定されており、日本各地で発生数の減少が懸念されている。本菌の保全と持続可能な食利用の両立を目指すうえで、日本列島における本菌の遺伝的構造や発生環境を明らかにすることは重要である。そこで本研究では、日本各地からニセマツタケの子実体を収集し、それらの遺伝的構造と宿主植物や地理的分布との関連を解明するとともに、その発生環境の特徴を明らかにすることを目的とした。2013年9月から2016年10月にかけて、千葉県、三重県、石川県、福井県においてニセマツタケの子実体を収集し、形態的特徴の観察を行うとともに、核rDNAのITS領域およびLSUの塩基配列を得て最節約法により系統樹を作成した。また、千葉県勝浦市のスタジイ・マテバシイ林と、石川県加賀市のコナラ・アカマツ林の2か所のニセマツタケ発生地に定点調査地を設定し、2015年10月から2017年5月にかけて植生および地温を調査した。ITS領域の系統解析の結果、日本産ニセマツタケは単系統群を形成したが、その系統群内でさらに遺伝的に差異のある3つの集団を形成した。これら3つの集団には、それぞれ千葉県と福井県のシイ・カシ林産、石川県と三重県のブナ科広葉樹林産、石川県のコナラ・アカマツ林産の標本が含まれた。発生環境の調査では、宿主植物は千葉県と石川県で異なっており、平均地温は千葉県で15.3℃、石川県で13.8℃であった。また、両地点ともシカやイノシシなどによる食害や掘り返しによって腐植層が発達しない傾向が認められた。本発表では、以上に基づき日本産ニセマツタケの遺伝的構造と発生環境の特徴について考察する。

A new coprophilous fungus from Asian elephant dung in highland Vietnam

Thao Phuong Nguyen¹, Toshimitsu Fukiharu², Kiminori Shimizu³, Dung Anh Nguyen⁴

¹Southern Institute of Ecology, Vietnam, ²Natural History Museum and Institute, Chiba, ³Tokyo University of Science, Japan, ⁴Tay Nguyen Univ., Vietnam

Fungi growing on herbivorous dung are called “coprophilous fungi” numerous species of Coprinoid fungi group have been recorded on these substrates. In Vietnam, only four species of Coprinoid fungi have been recorded as coprophilous fungi. During the study of fungi from Yok Don National Park, Dak Lak Province Vietnam, *Coprinopsis* sp. species was collected from Asian Elephant (*Elephas maximus*) dung. Based on the pileipellis veil characters with (sub) globose elements and densely fusiform or elongate diverticulate hyphae, this species belongs to section *Nivei*. Morphologically, species is similar to *C. iigarashi* and *C. nivea* in having type of elements but distinct from these species by basidiospores shape and the absent of pleurocystidia. Phylogeny based on the internal transcribed spacer regions (ITS) regions supported species as distinctive new species. Species *Coprinopsis* “*yokdonensis*” sp. nov is now preparing for publication.

山岡 裕一¹, 岡根 泉¹, 小野 義隆^{2, 5}, 升屋 勇人³, 細矢 剛⁴, 安藤 裕萌³, 藤森 祥平¹, 鈴木 浩之¹, 糸澤 千尋¹
¹筑波大・生命環境, ²茨城大・教育, ³森林総研・東北, ⁴国立科博, ⁵ブレインツリーバイオテクノロジー研究所

さび菌は担子菌類サビキン目（Pucciniales）に属する植物の絶対寄生菌で、1種が最大で5つの胞子世代を有することもある多型性であり、複雑な生活環を有する。冬胞子世代と担子胞子世代（あるいはそれに相当する世代）のみを有する短世代型さび菌のうち、冬胞子世代の形態が長世代種のさび胞子世代と同様の種を内生型さび菌（内生種）と呼ぶ。内生種の分類学的位置づけについてはこれまでも議論されてきたが、2011年の国際植物命名規約の変更により、“One fungus, one name”の考え方が導入され、長世代種との系統関係を明らかにした上で、その分類学的措置を検討する必要がある。そこで本研究では、日本産の内生種3種、ヘクソカズラに寄生する*Endophyllum paederiae*、アジサイに寄生する*Endophyllum* sp.、タブノキに寄生する*Monosporidium machili*について、18S（SSU）および28S（LSU）rDNAを用いた分子系統解析を行い、長世代種との系統関係を調査した。その結果、*E. paederiae*は、ヘクソカズラ–シバ類に異種寄生する*Puccinia zoysiae*と、*Endophyllum* sp.は、アジサイ類–スズタケに異種寄生する*Puccinia suzutake*と近縁であることが分かった。これらの結果は、これまで、宿主植物や形態的特徴から関連性が推定されていた内生種と長世代種の関係性を示唆するものである。一方、*M. machili*は、*Puccinia*を含むクレードには属さなかった。これまで*M. machili*は、精子器がタイプ5であることから*Phakopsora*との関係が推測されていたが、今回の解析結果からは特定な分類群との関係性を明らかにすることはできなかった。以上の結果より、これまで内生種は独立した属として扱われてきたが、系統関係に基づきそれぞれ*Puccinia*等のより適した属に移す必要があると考える。*M. machili*については、今後さらに検討が必要である。

折原 貴道
神奈川県博

地下生菌とは、地中やリター層にきのこを形成する菌類の総称であり、これらはきのこ（大型の子実体）を形成する菌類の非常に多くの系統において、並行的に進化してきたことが知られている。多くの地下生菌は自力で胞子を散布できず、昆虫や小型哺乳類などの小動物による摂食に胞子散布を頼っていると考えられている。担子菌門ハラタケ目に所属する地下生菌類ステファノスポラ属*Stephanospora* は、背着生のきのこを形成するリンドネリア属*Lindtneria* (= *Mycolindtneria*) などとの共通祖先から進化したことが明らかになっている菌群で、担子胞子が刺状突起に被われ、基部（担子柄周囲）にコロナと呼ばれるスカート状の突起物を有することが大きな特徴である。本属菌は汎世界的に分布しており、およそ20種が知られているが、日本国内からの学術的報告はまだなされていない。

本研究では、*Stephanospora* 属菌と考えられる子実体を国内の様々な地域から採集し、核DNA複数領域（リボソームRNA 遺伝子ITS・28S領域および*EF-1 α* 遺伝子）に基づく系統解析および形態学的検討を行った。その結果、日本産標本は*Stephanospora* 属内の二つのクレード（クレード1・2）に大別されることが示され、さらに少なくとも6つの種レベルの系統に分化していることが明らかになった。クレード1に含まれる日本産の菌は、子実体が淡黄色～鮮黄色で、比較的大型の担子胞子を形成し、特に担子胞子基部のコロナが著しく発達するのが特徴である。一方、クレード2に含まれる日本産の菌は、子実体が黄土色～汚黄色で、胞子は比較的小型、コロナはクレード1に含まれる菌に比べ発達しない点が特徴である。また、今回確認された種レベルの系統間の多くは、胞子や担子器の特徴などにより形態的に識別可能であった。また、これらのサンプルの中には南西諸島をはじめとした大陸島や、伊豆諸島などの海洋島から採集されたものも含まれていたが、これらと本土産の標本間には、地理的關係と対応した、種内レベルの明瞭な遺伝的分化の傾向は見られなかった。今後は解析に用いるサンプル数を増やし、系統間での形態的特徴や地理的關係性のより詳細な検討を進める予定である。

早乙女 梢¹, 弓岡 祐輔², 前川 二太郎¹, 中桐 昭¹, 服部 力³¹鳥取大・農, ²鳥取大・院農, ³森林総研

Melanoderma 属 (ハラタケ綱タマシヨレイタケ目) は, 子実体は多年生で無柄～半背着生, 傘表面に殻皮を有し, 孔口は類白色, 子実体の菌糸組成は原菌糸と骨格結合菌糸からなる2菌糸型, 菌糸はデキストリノイドを示し, 円筒形の担子胞子を有する白色腐朽菌を含む属である. 本属は2011年に新属として設立され, 現在, 中国南部の亜熱帯域で採集された標本に基づき新種記載された *M. microcarpum* (基準種) および *M. diciforme* が含まれる. 演者らは小笠原諸島における菌類調査において, 2012年～2014年の11月に母島・境ヶ岳周辺の広葉樹枯枝上に *Melanoderma* 属に属すると考えられるものの, 有蹄形の子実体を形成する未同定種を採集した. そこで, 本研究では, 本種の分類学的位置を明らかにするために, 子実体や培養菌糸の特徴を精査するとともに, 分子系統解析を行った. 培養性状の調査では, 菌糸成長速度は2.1–2.8 mm/日, 培養菌叢は綿毛状～マット状, 白色～類白色, 後に褐色の殻皮を形成した. 子実体の形態観察の結果, 子実体は多年生, 無柄～半背着生; 傘は蹄形, 幅は1.4 × 1 cm, 高さは1.5 cmまで, 傘表面は環溝を有する; 傘肉は木質～コルク質, 殻皮で被われる, 殻皮の厚さは15–40 μm; 孔口は類白色, 多角形～丸形, 5–6個/1mm. 担子胞子は円筒形, 大きさは5–8 × 2–3 μm; シスチジオールは便腹形, 15 × 5 μmまで. 本属既知種2種の基準標本と形態的特徴を観察・比較したところ, 小笠原産未同定種は子実体の全体形と大きさ, 孔口の大きさや殻皮の厚さでこれら2種とは区別された. 核LSUおよびITS領域に基づく分子系統解析の結果, *Melanoderma* 属2種と小笠原産未同定種は種毎に独立したクレードを形成し, それらは系統樹上でさらに同一の単系統群を形成した. 小笠原産未同定種は本属既知種とは形態学的特徴が異なり, また系統的にも区別されることから, *Melanoderma* 属の新種であると考えられる. 小笠原諸島は固有植物が多いことで知られるが, 菌類についても固有種が分布する可能性がある. 本種が確認されている地域では, 移入樹種であるアカギが繁茂し, 在来樹種が衰退しつつある. 今後も更なる調査を重ね, 本種の分布域や発生環境を明らかにするとともに, 保全の必要性を検討する必要がある.

吉田 有希, 玉井 裕, 宮本 敏澄
北海道大・院農

*Lepista*属は、キシメジ科 (Tricholomataceae) に属し、1870年にW.G.Smithによって設立され、*L. subaequalis*を基準種としている。日本においては、ムラサキシメジ (*L. nuda*) やコムラサキシメジ (*L. sordida*)、ハタシメジ (*L. irina*) などが報告されている。*Lepista*属菌について、*L. nuda*や*L. sordida*を含む一部の種が、形態形質の類似性から*Clitocybe*属に所属するべきであるという報告がある(Bigelow & Smith, 1969)。*Clitocybe*属は、1857年に設立され、*C. gibba*が基準種とされていた。現在は*C. gibba*が*Infundibulicybe*属に移されたため、ハイイロシメジ (*C. nebularis*) が基準種となっている。本研究では、*Lepista*属菌と近縁であるとされる種について、その類縁関係を分子系統解析によって探ることを目的とした。北海道で採取された*L. nuda* 7系統、*L. irina* 2系統、*C. nebularis* 1系統から、5.8sを含むrDNAのITS領域のシーケンスを取得し、GenBank上のデータシーケンスを加えて分子系統解析を行った。その結果、得られた系統樹は3つのクレードに分かれ、1. *Lepista*属菌とモウコシメジ (*Tricholoma mongolicum*) で構成されるクレード、2. *C. nebularis*を除く*Clitocybe*属菌と*L. irina*によって構成されるクレード、3. *C. nebularis*のみで構成されるクレード、となった。*Lepista*属と、*Clitocybe*属の基準種である*C. nebularis*は分子系統的に離れており、それ以外の*Clitocybe*属菌は*L. irina*と近縁であることが分かった。また、*T. mongolicum*は、中国北部やモンゴルの草原上に白色の子実体を発生させる種であり、2011年にYu et al. により、新属*Leucocalocybe*属に移すべきであると報告されているが、本研究では、ITS領域を基にした解析の結果、*Lepista*属、特に*L. nuda*と近縁であることが分かった。

糟谷 大河¹, 池側 静華¹, 保坂 健太郎²¹千葉科学大・危機管理, ²国立科博・植物

イッポンシメジ科に属するキイボカサタケ*Entoloma murrayi*, アカイボカサタケ*E. quadratum*とシロイボカサタケ*E. album*は主に子実体の色の差異により識別され、それぞれ独立種として扱われてきた。しかし、担子胞子の形や大きさなどの顕微鏡的特徴や、子実体の色以外の肉眼的特徴は類似しており、生態的な特徴も一致する。またアカイボカサタケには、橙色型と帯黄淡紅色型の、やや異なった2つの色を示す子実体の存在が認められている。以上のようにこれら3種の識別形質は明確でなく、系統関係も明らかになっていないため、これらの分類学的再検討が必要である。そこで本研究では、日本各地からキイボカサタケ、アカイボカサタケとシロイボカサタケなどのイッポンシメジ属菌の子実体を収集し、分子系統解析と形態的特徴の観察を行い、これらの分類学的再検討を行うことを目的とした。日本各地で採集した子実体について、核rDNAのITS領域とLSUの塩基配列を得て、最節約法による系統解析を行った。また、子実体の肉眼的特徴の観察と、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡による担子胞子の形態観察を行った。系統解析の結果、従来の識別形質に基づきキイボカサタケ、アカイボカサタケの橙色型およびシロイボカサタケとみなした標本は単系統群を形成した。本系統群を形成した標本は担子胞子が立方体状で、傘表面は繊維状であり、柄の肉は薄くもろかった。一方、アカイボカサタケの帯黄淡紅色型は独立した単系統群を形成した。この系統群を形成した標本は、担子胞子の角が隆起して丸みを帯び、傘表面は平滑で、柄の肉は厚く堅かった。以上より、アカイボカサタケの橙色型は、形態的特徴と系統的位置からキイボカサタケと同一種であり、キイボカサタケは子実体の色の変異が大きく、色のみに基づく誤同定が生じる可能性があることが明らかとなった。なお、シロイボカサタケの標本は、これらを含む系統群内でさらにサブクレードを形成したため、キイボカサタケの種内変異とみなし、キイボカサタケの品種として取り扱うことが適切である。一方、独立した単系統群を形成したアカイボカサタケの帯黄淡紅色型は、形態的特徴から狭義のアカイボカサタケであると示唆された。これら3菌群においては、担子胞子の形態、傘表面の形態と柄の肉質が系統を反映しており、重要な識別形質であることが明らかとなった。

名部 みち代¹, 池側 静華², 保坂 健太郎³, 糟谷 大河²¹兵庫県神戸市, ²千葉科学大・危機管理, ³国立科博・植物

イッポンシメジ属は担子菌門ハラタケ目イッポンシメジ科に属し、ハラタケ目内ではフウセンタケ属に次いで大きな属であり、1000種以上を含むと推定されている。イッポンシメジ属菌の子実体は傘と柄を持つハラタケ型から、地下に子実体を形成する腹菌型まで非常に多様な形態を示すが、いずれもピンク色を帯び、角ばった担子胞子を形成する点で特徴づけられる。また、本属菌は極地から熱帯まで、南極大陸を除く全大陸の多様な環境下に分布し、多くは腐生性であるが、一部の種は植物と菌根を形成する。近年の分子系統学的研究の結果、本属菌は単系統群をなすことが示されており、形態的、生態的に著しい多様化を遂げた分類群である。しかし、日本においてはこれまでに約60種のイッポンシメジ属菌が認められているのみであり、その多様性は十分に解明されていない。演者らは、日本産イッポンシメジ属菌の系統分類学的研究を進める中で、日本から未報告の *Entoloma catalaunicum* を兵庫県神戸市と千葉県東庄町より採集したので、その子実体の形態的特徴と系統的位置について報告する。本菌は子実体全体が淡橙色ないし淡肉桂色を呈する小型菌で、傘の径は5 cm未満、しばしば縁部が濃青色を帯び、条線を欠く。ひだは直生し、やや疎、類白色のち肉色。縁部は鋸歯状ないしざらざらした粉状で、濃青色あるいは肉桂褐色。肉は薄く、特別な味やにおいはない。柄は上下ほぼ同径で中空、淡橙色、下方に向かって淡色、基部は白色の菌糸に覆われる。担子胞子は8-11(-12) × 6.5-8 μm、5-6角形で淡紅色。縁シスチジアは多生し、32-63 × 7-18 μm、円筒状、類紡錘形、フラスコ形などで、時に隔壁を有し、細胞内に青紫色の色素をもつ。側シスチジアはない。草地上や林内の落葉堆積上に群生する。ヨーロッパ産標本は柄が青味を帯びる点で日本産標本とやや異なっている。日本産 *E. catalaunicum* の標本より、核rDNAのITS領域とLSUの塩基配列を得て最節約法により系統解析を行った。その結果、日本産 *E. catalaunicum* の標本は単系統群を形成し、フィンランド産 *E. caesiocinctum* と姉妹群をなした。今後はヨーロッパ産 *E. catalaunicum* の塩基配列を含めた解析を行い、種内における系統関係をより詳細に明らかにする必要がある。

糸澤 千尋¹, 加藤 彩², 山岡 裕一¹¹筑波大学生命環境系, ²長野県南信州農業改良普及センター

2012-13年に茨城県各地でヤガミスゲ、アサマスゲ、クロカワズスゲ上に形成された*Puccinia*属菌の夏孢子・冬孢子（以下ⅡⅢ）世代を採集した。それぞれの採集地ではヨモギ上で精子・さび孢子（以下0Ⅰ）世代を同時に採集することができたため、これらのスゲ類とヨモギを異種寄生している可能性を考え接種試験を行った。各スゲ上の冬孢子を用いて、0Ⅰ世代宿主の可能性が考えられた複数種に接種したところ、ヨモギのみに精子器とさび孢子堆が形成された。その後さび孢子を用いて戻し接種を行い、各スゲ上での夏孢子堆の形成を確認した。ヤガミスゲ、アサマスゲ、クロカワズスゲを宿主とする系統（以下、ヤガミスゲ系統、アサマスゲ系統、クロカワズスゲ系統と呼ぶ）の分類学的位置付けを明らかにするため、形態観察および分子系統解析を行った。試料として、この3系統に加え、スゲ類とヨモギ類を異種寄生する*P. dioicae* var. *micropuncta*, *P. caricis-stipatae*, *P. caricis-macrocephalae*の既知種3種の標本および配列データを供試した。さらに、県内各地で採集したヨモギ上の0Ⅰ世代標本も供試した。ITS2領域およびD1/D2領域の塩基配列を用いてML法により系統樹を作成した結果、既知種からなる3クレードに加え、ヤガミスゲ系統、2016年稲敷市で採集したヨモギ上の*Aecidium* sp.からなる2クレードが形成された。ヤガミスゲ系統クレードは*P. dioicae* var. *micropuncta*クレードと姉妹群をなし、*Aecidium* sp.クレードは*P. caricis-stipatae*クレードと姉妹群を形成した。アサマスゲ系統とクロカワズスゲ系統は*P. dioicae* var. *micropuncta*クレードに含まれた。形態観察の結果、ヤガミスゲ系統は、その他の菌群とは識別可能であった。しかし、アサマスゲ系統とクロカワズスゲ系統は、*P. dioicae* var. *micropuncta*との間に明らかな差異は見られなかった。また、さび孢子に関しては各集団間で明確な差はなかった。以上の結果より、ヤガミスゲ系統は既存の3種とは別種であると考ええる。*Aecidium* sp.は*P. caricis-stipatae*と近縁な別の種の可能性が高いが、ⅡⅢ世代を探索し詳細な形態比較を行う必要がある。アサマスゲ系統とクロカワズスゲ系統は*P. dioicae* var. *micropuncta*と同定した。

柴田 紗帆¹, 西村 武祥¹, 蓑島 綾華¹, 加藤 綾奈², 堀江 博道¹, 柿島 眞³, 廣岡 裕吏¹

¹法政大植物医科, ²東京都八丈支庁, ³吉林農業大学

ヤブニッケイもち病菌 (*Exobasidium hachijoense*) は東京都八丈島のヤブニッケイ (*Cinnamomum japonicum*) の枝や幹の不定芽に特異的に寄生し、特徴的な鹿角状の子実体を形成するモチビョウキン目の一種である。本菌は1985年にIijimaらにより *E. hachijoense* として初めて記載されたが、その属の所属については、1982年にJülichによって近縁種である *Exobasidium laurii* が *Laurobasidium* 属へと変更されていたため、長い間属の再検討の必要性が指摘されていた。2017年、Kakishimaらは本菌の詳細な形態観察、遺伝子解析を行い、*Laurobasidium hachijoense* として属の新組み合わせを行った。ところが、本菌のホロタイプ標本は所在が不明であることが新たに明らかとなった。そこで、我々はヤブニッケイもち病菌の新しいタイプを指定することで、本菌の同定診断の一助となることを目的とした。Iijima et al. (1985) の原記載によると、ホロタイプ以外の標本の記録は存在しない。そこで、命名規約第9条に従い *E. hachijoense* の原記載のFig.1をレクトタイプ、2016年にタイプロカリティから採集された標本をエピタイプ、そしてその分離菌株をタイプカルチャーとして指定することを提案したい。

前川 富也

農研機構 中央農業研究センター

ダイズは根に根粒を着生し、根粒を通じて窒素固定された窒素を自分の栄養素として活用している。この根粒の働きは、一般的にはアセチレン還元能を用いて測定する。アセチレン還元能（根粒窒素固定活性）は、様々なストレス（土壌の温度、土壌水分、地上部のバイオマス等）により低下することが知られているが、根粒菌とダイズ品種の組み合わせや根粒菌の接種源種による影響も大きいと考えられる。発表者はこれまでポットにダイズを栽培し、培土に「アセチレン+空気」を通気すること（通気型アセチレン還元活性測定法）でアセチレン還元能を非破壊的に測定してきた。各根粒菌種の根粒窒素固定活性の菌種間差の情報はすくなく、一部USDA110の活性が優れているとの報告がある。しかしながら、それらの報告は単一菌種の接種による測定で複数の菌が共生している条件下での測定は知られていない。本研究は、根分け法と通気型測定法を組合わせた実験系を用いて、根分け法の片側の区画に別の菌を接種することで異なる根粒菌が共生する状態での個々の菌の根粒窒素固定能力を測定することを目的として実施した。エンレイを人工気象室で栽培し、播種後1週間後に根分け法で物理的に分けられた2つのポットに根を分けて栽培した。根分け法の各区画に、異なる根粒菌種（USDA110とUSDA6）の根粒菌培養液を接種した。その後、通気型アセチレン還元測定システムを用いて、各両側の区画の根粒窒素固定活性を測定した。両区画にUSDA110を接種した場合は両方の根粒窒素固定活性が同程度を示し、USDA6も同様の傾向がみられた。片側に異なる菌種を接種した場合、USDA110、6のどちらでも根粒窒素固定活性が単独の場合より高くなる傾向があった。また、一般的に知られている様にUSDA110の方で根粒窒素固定活性が高かった。以上のことより、単一の菌種を接種した場合と同じような根粒窒素固定活性の根粒菌種間差がみられる結果となった。また、混合接種では根粒窒素固定活性がわずかだが高くなる傾向があった。

森永 花菜¹, 豊福 雅典², 尾花 望², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境科学研究科, ²筑波大・生命環境系

多くの細菌は多様なシグナルを介して相互作用し、様々な遺伝子を制御している。グラム陰性細菌で最も保存されているシグナルとして *N*-acyl homoserine lactone (AHL) が挙げられる。AHLはアシル基とラクトン環から構成されており、アシル基の長さがC4からC18までが報告されている。細菌間情報伝達の成立には、シグナルが細胞から放出され、拡散し、周囲の細胞に届くことが必要となる。しかしながら長鎖AHLは疎水性が高いことより環境中に拡散しづらいと考えられており、長鎖AHLがどのように伝達されるのかは未解明な部分が多かった。当研究室ではC16-HSLを産生するグラム陰性脱窒細菌、*Paracoccus denitrificans*は、細胞膜から形成される膜小胞・メンブレンベシクル (MV) に C16-HSLを内包して細胞に伝達することを明らかにした (Toyofuku, *et al.*, 2017, ISME J)。

しかしながら、*P. denitrificans*がMVを介した情報伝達によって、どのような形質を制御するのかは未解明である。そこで、本研究ではC16-HSL制御下の形質とその制御メカニズムを明らかにすることで、MVを介した情報伝達の生態的意義を解明することを目的とした。*P. denitrificans*のC16-HSL非生産株 ($\Delta pdnI$) では顕著な凝集性を示したことから、*P. denitrificans*はMVやC16-HSLを介して凝集体形成を抑制することが示された。さらに、凝集体形成因子を明らかにするため、 $\Delta pdnI$ のゲノムにトランスポゾンランダムに挿入し、非凝集性株を選抜した。選抜した非凝集性株のうち、多くが推定多糖合成遺伝子 (Pden_0842) にトランスポゾンが挿入されていた。また、Pden_0842のmRNA量をreal-time PCRにより定量した結果、Pden_0842の発現はC16-HSLによって抑制されていることが明らかとなった。以上より、*P. denitrificans*はMVによって運搬されるC16-HSLを介してPden_0842を抑制することで、凝集体形成を回避していることが示唆される。C16-HSLは疎水性が高く環境中に分散しづらいと考えられるが、MVに含まれることで、より長距離間でのシグナル伝達が可能となることが考えられる。

杉浦 優太, 齋藤 勝晴
信州大・農

アーバスキュラー菌根菌（AM菌）は多くの陸上植物と相利共生関係を築いている。植物は光合成産物である糖をAM菌に供給し、一方でAM菌は土壤中から吸収したリン酸などの養分を植物に供給する。AM菌のリン輸送機能を活用しリン酸質肥料を削減するため、AM菌の微生物資材が開発されている。しかし、AM菌は植物根と共生することでしか増殖できないため、微生物資材の高い生産コストが問題となっている。本研究では、純粋培養によるAM菌の増殖を目指し、AM菌の胞子形成に対する脂肪酸と糖の効果を評価した。AM菌増殖に必要な候補物質を効率的にアッセイするため、マイクロプレートを用いた菌糸培養系を構築した。12穴マイクロプレートに改変M培地を加え、無菌的な*Rhizophagus irregularis* DAOM197198の胞子を約100胞子接種し、CO₂インキュベーター（2% CO₂, 28℃）で数か月間培養した。改変M培地に各種脂肪酸を添加し胞子形成を経時的に観察したところ、パルミトレイン酸添加時にのみ娘胞子の形成が多くみられ、接種後4か月目には親胞子とほぼ同数の娘胞子が形成された。しかし、胞子直径は親胞子の半分程度であった。ラウリン酸は胞子形成に対する効果は無いものの、菌糸を伸長させる効果が大きかった。胞子形成に効果があったパルミトレイン酸に各種の糖（グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、ラクトース、ラフィノース、グルクロン酸、ガラクトツロン酸）を組み合わせ、胞子増殖に及ぼす影響を調査した。ガラクトースまたはグルコースを添加することで胞子数が増加し、接種後4か月目には親胞子の2倍程度の娘胞子が形成された。しかし、依然として胞子直径は親胞子の半分程度であった。グルクロン酸とガラクトツロン酸は胞子形成に対する効果はなかったが、菌糸分岐を促進させる効果が認められた。

清水 大地¹, 北出 理², 雪 真弘³, 大熊 盛也^{3, 4}, 野田 悟子¹¹山梨大・院生命環境, ²茨城大・理, ³理研・BMEP, ⁴理研・JCM

【背景】シロアリの腸内には原生生物や原核生物が共生しており、複雑な共生関係を構築している。日本に生息する *Reticulitermes* 属のシロアリ5種には Teranymphidae 科の *Teranympa* 属原生生物が、オオシロアリ (*Hodotermopsis sjostedti*) には同科の *Eucomonympha* 属原生生物が複数種共生している。両原生生物種の細胞内には *Treponema* 属細菌が共生しており、窒素固定と還元的酢酸生成といった宿主にとって重要な機能を担っている。本研究では、宿主シロアリと Teranymphidae 科原生生物、細胞内共生細菌の系統関係を比較することで、互いの種分化に与えた影響を明らかにすることを試みた。**【方法】**宿主シロアリ (*Reticulitermes* 属5種) のミトコンドリアにコードされる3つの遺伝子(COI, COII, 16S)と、原生生物の小サブユニットrRNA遺伝子、細胞内共生細菌の16S rRNAと *gyrB* 遺伝子を取得して、塩基配列を決定した。最尤法と Bayes 法により系統解析を行い、それぞれの樹形を比較した。**【結果と考察】***Teranympa* 属と *Eucomonympha* 属の原生生物はそれぞれ単系統群を形成し、細胞内共生細菌も宿主原生生物の属ごとに単系統群を形成した。細胞内共生細菌の遺伝子の相同性は、同属原生生物内では16S rRNAが98.6%以上、*gyrB*では92.0%以上と高かったが、原生生物属間では16S rRNAが97.1%以下、*gyrB*では91.9%以下と低かった。*Teranympa* 属原生生物と宿主シロアリ、細胞内共生細菌の系統関係を比較したところ、多くの分岐で共種分化が推定された。*Reticulitermes* 属の祖先には、同所分布する *Hodotermopsis* 属のシロアリから原生生物が移入したと推定されている。これらのことから、*Reticulitermes* 属に細胞内共生細菌をもつ *Teranympa* 属の祖先種が移入した後、シロアリの種分化に伴い *Teranympa* 属も共種分化したことが示唆された。一方、*Eucomonympha* 属原生生物と細胞内共生細菌の系統関係は一致しない場合もあった。オオシロアリの腸内には少なくとも3系統の *Eucomonympha* 属原生生物が共存しているため、原生生物種間で寄主転換が起こりやすいと考えられる。

裕田 翔輝¹, 愛須 加菜², 今神 広紀², 松田 陽介¹¹三重大学大学院生物資源学研究科, ²三重大学生物資源学部

はじめにマツ科樹木の細根には担子菌類や子囊菌類に属する菌根菌が共生しており、海岸に生育するクロマツには *Cenococcum geophilum* (以下, Cg) が優占して菌根を形成する。菌根周囲の菌根圏には様々な細菌が生息しており、なかには菌根菌の成長を促進させるものが存在する。これらはMycorrhiza helper bacteria (以下, MHB) と呼ばれており、*Pseudomonas*属や*Streptomyces*属などが報告されている。しかし、土壌中に豊富に存在し、二次代謝物の産出能が高いことから有用な分類群として注目されている放線菌類におけるMHBの知見はほとんどない。本研究では、菌根菌の生育を促進する放線菌MHBの探索を目的とし、Cg菌根から分離された放線菌をCgと他の糸状菌を用いて対峙培養試験を行った。材料と方法Cg菌根の表層と中心付近から分離した放線菌、それぞれ73, 8菌株を1/2PDB培地を用いて30℃暗条件で一週間培養した。この培養液を直径9 cmの1/2PDA平板培地の中心から3 cm離れたところにそれぞれ放線菌を4菌株ずつ接種した。接種は培養液40 μ Lを滅菌したペーパーフィルターに滴下し、コントロールには滅菌水を用いた。さらに、中心に直径6 mmのCg菌叢ディスクを接種し30℃暗条件で2ヶ月間培養した。海岸のクロマツ実生から分離した糸状菌 (*Pestalotiopsis*属菌) に対しても同様の接種処理を行い、同一条件で1週間培養した。糸状菌に対して拮抗作用を示した菌株については、培養液をフィルター滅菌して同一の接種試験をすることで放線菌株からの代謝物による糸状菌への効果を調べた。結果と考察用いた放線菌81菌株のうちCgに対して菌糸伸長に影響を与えないものが33菌株、抑制するもの41菌株であった。一方、糸状菌に対しては明瞭な拮抗作用を示す菌株が23株確認されたが、代謝物のみの接種ではいずれも拮抗作用を示さなかった。現在、接種に用いた放線菌株の16S rDNAの塩基配列を解読することで分子遺伝学的な情報も収集中である。以上より、Cg菌根圏から分離された放線菌菌株がCgや糸状菌の生育に及ぼす影響について議論したい。

藤森 祥平, 阿部 淳一 ピーター, 山岡 裕一
筑波大学生命環境系

ラン科植物の広義ネジバナ（以下ネジバナ）は小笠原を除く日本全土に分布している。ネジバナは担子菌門アンズタケ目に属す3属（*Rhizoctonia*, *Ceratorhiza*および*Epulorhiza*）と菌根共生し、中でも*Epulorhiza*属が主要な菌根菌である。演者らは、2011-2016年に日本各地から採取したネジバナの菌根菌相を調べ、ネジバナの菌根菌として少なくとも*Epulorhiza*属7つのOTUが存在し、ネジバナがこれまで考えられていたよりも広い範囲の菌群と菌根共生することを明らかにした。また、この7つのOTUの中で、3つのOTUが北海道から沖縄までの広い範囲で菌根共生していることを明らかにし、日本菌学会第60回大会で報告した。これらのOTUは分離菌株が得られたため分類学的検討が可能となり、それぞれ別種として扱うことが妥当であることが示された。その後、これら3種についてデータの解析を進めた結果、各採集地において検出頻度の高い菌種が異なることがわかった。そこで本研究では、ネジバナ菌根における菌種の選択に環境要因が影響していると考え、3種（*E. repens* A, *E. repens* Bおよび*Epulorhiza* sp.2）についてその要因を明らかにすることを目的とした。各地点において、*Epulorhiza*属菌を検出した根に対するそれぞれの菌種を検出した根の占める割合を算出し、その菌種の出現率とした。各菌種の地点ごとの出現率と環境要因についてロジスティック回帰し、分散分析による尤度比検定をおこなった。その際に有意差が見られた要因についてAIC値からその菌種の優占に対する影響の強さを評価した。その結果、平均気温が0℃未満の日数、降水量は3種の全てで共通して出現率と相関する要因であることが示された。また、菌種ごとに優占に関わる要因が異なり、*E. repens* Aは温暖な低地で、*E. repens* Bは温暖で湿潤な低地で、そして*Epulorhiza* sp.2は湿潤で冷涼な高緯度地域で優占して菌根共生することが示唆された。以上のように、各地のネジバナはその場で出会った菌とランダムに菌根共生しているのではなく、環境要因の影響を受けて共生する菌根菌の選択がおこなわれていることが明らかになった。

雪 真弘¹, 桑原 宏和², 河合 幹彦², 伊澤 和輝², David Starns³, 清水 美智留³, 野田 悟子⁴, 本郷 裕一^{2, 3}, 大熊 盛也^{1, 3}
¹理研CSRS・BMEP, ²東工大・生命理工, ³理研BRC・JCM, ⁴山梨大・生命環境

シロアリの腸内には、原生生物、細菌、古細菌が共生し、さらに原生生物の細胞内、細胞外にも細菌が共生した多重共生関係が構築されている。ヤマトシロアリ腸内に共生する *Dinenympha* 属原生生物の細胞表面には Bacteroidales 目の '*Candidatus Symbiothrix dinenymphae*' が共生しており、そのシングルセルゲノム解析から多数の糖質加水分解酵素を有し、宿主原生生物と協調したリグノセルロース分解を行っている可能性が示唆されている。コウシュンシロアリ腸内に共生する *Devescovina* 属原生生物にも Bacteroidales 目の '*Candidatus Armantifilum devescovinae*' が細胞表面を覆うように共生している。これまでの研究から、'*Ca. Armantifilum devescovinae*' は窒素固定に関与し、*nifH* と *anfH* の2種類のニトロゲナーゼリダクターゼ遺伝子を有していることが報告されている。しかし、遺伝子発現しているのは、ほとんど *anfH* であり、その原因は不明であった。本研究では、'*Ca. Armantifilum devescovinae*' をシングルセルゲノム解析することにより、この原因の解明と原生生物との共生関係における役割を明らかにすることを目的とした。

シングルセルゲノム解析の結果、ゲノム完全性が94%のドラフトゲノム配列が得られ、'*Ca. Symbiothrix dinenymphae*' と比べ糖質加水分解酵素遺伝子は少なく、リグノセルロース分解への寄与は小さいと推察された。また、これまでに報告されている *nifH* と *anfH* が含まれる各オペロンも確認された。*nif* オペロンの *nifD* と *nifK* の間には、Abortive infection phage resistance protein (AIPR) 遺伝子が挿入されていた。AIPR はファージに感染すると細胞死を引き起こすタンパク質と推定されており、*nif* オペロンへの AIPR の挿入が *nifH* の遺伝子発現が抑えられている原因の一つであると考えられた。本大会では、'*Ca. Armantifilum devescovinae*' の原生生物との共生関係における役割と CRISPR/Cas システムを含むファージ感染耐性機構を議論する。

はじめに：高等シロアリの中のキノコシロアリは、巣内の菌園で菌類を栽培する。キノコシロアリはアジア、アフリカに分布し、子実体の発生が報告されている。日本では沖縄県でタイワンシロアリが菌園を作り、ここからオオシロアリタケ *Termitomyces* sp. が発生する。しかし、タイワンシロアリは土壌中に営巣し、シロアリの生態、あるいは菌園の存在状況を調べるのが非常に難しい。子実体は、中国、タイ、フィリピン、ベトナムなどで優秀な食用菌として市場流通しており、沖縄県では美味なきのことして王朝時代から珍重されてきた。ここでは、本菌子実体の人工栽培を目指し、培地作製のための各種成分の配合割合を検討するために、沖縄県のタイワンシロアリ菌園の菌類による成分分解を調査した。試験方法：沖縄県石垣市（石垣島）と八重山郡竹富町（西表島）において、2011、2012、2014、2017年に土壌中巣内からそれぞれ5、2、2、3個の菌園を掘り出した。巣内の状態を基に、菌園を上下二等分し、それぞれのリグニン、ヘミセルロース、セルロースの割合、および、炭素と窒素の比、元素量（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、リン、アルミニウム、鉄、マンガン）を定法により測定した。試験結果：菌園の上部と下部を比較すると、上部でリグニンとヘミセルロースの比が大きく、下部でセルロース比が大きかった。菌園下部で炭素比は有意に小さく、逆に窒素比は大きく、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、鉄、マンガンの含有量は有意に多かった。リン含有量については、上部と下部で差がなかった。これらから、菌類により、菌園上部のリグニン、ヘミセルロースは分解され、下部において窒素、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、鉄、マンガンが増加したことが示唆された。

桂本 拓弥, 玉井 裕, 宮本 敏澄
北大院農

ハスカップ (*Lonicera caerulea* L.) は勇払湿原をはじめとする泥炭地に自生する、スイカズラ科の落葉性低木である。その実は食用となり、主に北海道で栽培されている。湿地由来の泥炭土壤に生育する植物は過湿・酸性・貧栄養等のストレスを受けるが、近年、エンドファイトがこうしたストレスの緩和に関与することが考えられている。演者らは、北海道勇払湿原の酸性泥炭土壤に生育するハスカップの根部共生菌の感染様態の観察およびエンドファイトの単離を行ってきた。細根部ではAM菌とDSEの共存が確認でき、5.8S rDNAを含むITS領域の塩基配列の相同性解析の結果、*Oidiodendron* spp.や*Phialocephala* sp.など子囊菌10種が推定された（2016年菌学会大会）。

本研究ではハスカップからさらなる根部エンドファイトの探索と、それらの共生能を探ることを目的とした。これまでに単離したエンドファイトに新たに単離した系統を加え、オートミール寒天培地上においてハスカップへの接種試験を行って共生能を検証した。根部の観察の結果、*Oidiodendron* sp. 1は表皮から皮層の細胞内および根毛の内部に強い感染がみられる等、エンドファイトによっては特異的な共生様態を示した。

田中 志貴子^{1,2}, 新里 尚也^{1,5}, 齋藤 星耕^{1,4}, 青山 洋昭^{1,3}, 白井 由実¹, 朴 相和¹, 伊藤 通浩¹, 田中 淳一²
¹琉球大・熱生研, ²琉球大院・理工, ³琉球大・戦略セ, ⁴沖縄大・経済, ⁵産総研・生物プロセス

海綿からは様々な生理活性物質が単離されており、これらは海綿に付随する微生物（共生微生物）が生産していると考えられているが、その微生物の大半が難培養性である等の理由により、詳細は明らかになってない。この海綿に由来する生理活性物質の生産を担う微生物の同定および、生合成経路の解明は、その学術的、応用学的研究展開を図る上で重要である。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、共生微生物を対象とした網羅的な微生物相解析を行い、生理活性物質と共生微生物の関係を探ることを目的とした。本研究では、アクチンの重合阻害活性を示す化合物、latrunculin を共通に含有する海綿2種、*Cacospongia mycofijiensis* ならびに、*Negombata* sp.、加えて多様な生物活性を示す化合物、Manzamineを共通に含有する海綿2種、*Haliclona* sp. ならびに *Acanthostrongylophora* sp. を研究対象とした。沖縄島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V3-V4領域をPCR増幅、Roche 454 GS Jr. ならびに、illumina Miseq を用いてシーケンスを行なうことで、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。シーケンスにより得られた配列の内、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行った結果、試料あたりそれぞれ156~273のOTU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行った。その結果、latrunculin 共通含有海綿2種では、*Cacospongia*でChloroflexi (13-21%) や Proteobacteria (18-23%) が比較的高い割合で検出され、*Negombata*ではProteobacteria (78-80%) が優占していることが示された。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、同一OTUではなくとも、系統学的に近接した種 (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、今後、詳細に検証して行く予定である。また、現在、Manzamine含有海綿試料間のバクテリア相の比較も進めており、この結果についても報告する予定である。

岡根 泉¹, 井上 貴仁², 石賀 康博¹, 出川 洋介¹, 細矢 剛^{1, 3}, 山岡 裕一¹
¹筑波大・生命環境, ²広島県・西部農業技術指導所, ³科博・植物研究部

近年、欧州においてセイヨウトネリコ (*Fraxinus excelsior*) などに壊滅的な立枯れ病'Ash dieback'を引き起こすことが報告されている*Hymenoscyphus fraxineus*は東アジアが起源地と考えられている。しかし、日本では、本菌による立枯れ病の報告はなく、ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*) の落葉上で腐生的に生息し子嚢盤を形成することが知られているが、生活環を含む本菌の生態については不詳である。ヤチダモに立枯れ病を引き起こすことなく共生的な関係を維持する*H. fraxineus* の生活環解明は、本菌による病害の総合防除を検討する上でも重要である。そこで本研究では、ヤチダモ上での本菌の生活環を明らかにするため、筑波大学菅平高原実験センター内の成木および植栽苗から経時的に採取した生葉から菌の分離・同定、および菌体DNAの検出と定量を行い、また、落葉した葉軸上での菌の挙動についても経時的に観察した。その結果、表面殺菌した健全なヤチダモの生葉から*H. fraxineus* が分離され、菌体DNAの定量実験では7-9月において極微量な検出濃度であったが、10月では高濃度でDNAが検出された。葉軸上での菌の観察では、11月と12月に回収した葉軸上でフィアライドの形成およびUV照射による子嚢盤形成誘導を確認した。1月には葉軸の皮層直下に偽菌核層が形成され始め、以降は徐々に葉軸の表皮・皮層が分解され、偽菌核層が露出した。以上より、本菌の生活環は次のように考えられた。すなわち、7月から9月にかけて偽菌核化したヤチダモの葉軸上に子嚢盤を形成し、放出された子嚢胞子が葉に到達し組織内部へ侵入、その後は静止状態でとどまり、葉が落葉期に移行するのに伴い菌糸を伸長させ落葉を迎える。落葉後は、11-12月の間に交配を行い、その後皮層直下に葉軸を覆うように偽菌核層を形成し、2月以降になると葉軸の表皮と皮層が分解され、偽菌核層が露出し始め、7月から9月にかけて偽菌核層に覆われた葉軸上に形成した子嚢盤から子嚢胞子を飛散させる。本研究より、*H. fraxineus*はヨーロッパにおいては重要な病原菌として認識されているが、日本に生育するヤチダモの生葉上では内生菌として生息し、落葉上では腐生菌として生活していることが明らかとなった。

澤田 祥子¹, 中岡 知規¹, 西山 紋加², 吉水 芳織², 黒田 雄亮², 阿野 貴司^{1, 2}, 岡南 政宏^{1, 2}

¹Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., ²Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.

土壌細菌の中には植物との間で相互作用し、植物に対して有益な効果を与え、植物の生長を促進するものが存在する。それらは植物生長促進細菌（plant growth-promoting bacteria: PGPB）と呼ばれている。PGPBは、植物ホルモン様物質の産生やリンの可溶化、シデロフォア産生による鉄の可溶化などを行うことにより、直接的に植物生長促進（plant growth promotion : PGP）作用を示すと考えられる。一方、一部のPGPBでは、直接的なPGP作用に加えて植物病原菌の増殖を抑える抗生物質や病原性真菌の細胞壁を溶解する溶菌酵素、三価の鉄イオンを利用する植物病原菌の増殖抑制を導くシデロフォアの産生などによって間接的にPGP作用を示すものも知られている。一部のPGPBは陸上植物だけでなく、水生植物にもPGP作用を示すことがわかっている。これらのPGPBは従来の化学農薬に代わり微生物農薬としての利用が期待されている。我々は、これらのPGP作用を1つもしくは複数もつ新規のPGPBの単離を目的に実験を行った。我々は、ウキクサ（*Lemna aoukikusa*）を用いて新規のPGPBの単離を試みた。環境中（土壌圏または水圏）から単離した単離菌をウキクサの液体培地に添加し、PGP作用を評価した。その結果、ウキクサの体積の増大、個体数の増加、あるいは、根の伸長の促進を導くPGPB候補株を複数得た。得られたPGPB候補株についてPGP作用が特に強かったものに関してはグラム染色や16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析を行い、菌種の同定を行った。また、植物病原菌との対峙培養によって抗菌作用の有無を調べた。現在、水生植物であるウキクサに代わり、陸生植物でありモデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を用いて、微生物農薬としての有用性の検討およびPGP作用の分子メカニズムに関する知見の収集を行っているところである。本大会では、これらについて報告したい。

佐々木 和浩^{1,2}, 増田 幸子^{1,3}, 風間 ゆり¹, 木皿 千春¹, 竹田 晶子¹, 半澤 栄子¹, 南澤 究¹, 佐藤 雅志^{1,4}
¹東北大・院生命, ²東京大・院農学生命, ³理研・CSRS, ⁴東北大・院農

Azospirillum sp. strain B510は、イネの分げつを増加し収量を向上させる接種効果を持つ。その接種効果には品種間差異が認められており、微生物資材としての有効利用には、原因を特定することが必要である。本研究では、B510の接種応答に関わる遺伝子座（QTL）を検出することを目的とし、幼苗期の種子根の生育の違いに着目した。B510接種によって、日本晴の根は著しく抑制されるが、これに対し、カサラスの根は応答することなく無接種区と同様の根長となった。そこで、応答の差異に関する遺伝子座を特定するために、日本晴を戻し親とした戻し交雑自殖系群を用いてQTL解析を行った。無接種区の根長（RLC）に対し、接種区の根長（RLI）の変化の割合をRRLとして、それぞれを表現型値とした。カサラスがポジティブアレルの3つのQTL（*qRLI-6*、*qRLC-6*および*qRRL-7*）が検出され、寄与率は20.2%、21.3%および11.9%であった。このうち*qRRL-7*を含む領域が置換している系統（CSSL33）にB510を接種した結果、根長が短くならず、日本晴と異なる反応を示した。以上の結果から、*qRRL-7*は、*Azospirillum* sp. strain B510の接種に対する根長を制御する主要遺伝子座であることが示唆された。今後、B510に対する*qRRL-7*の圃場での接種応答が明らかになれば、接種効果の高い品種育成に貢献できると期待される。

竹下 和貴¹, 山田 尊貴¹, 成廣 隆², 鎌形 洋一², 新里 尚也^{1, 2}¹琉球大・熱生研, ²産総研・生物プロセス

自由生活性の嫌気性纖毛虫（単細胞真核生物）の一部は、代謝により発生する水素を消費してメタン生成を行うメタン生成アーキア（古細菌）と機能未知のバクテリア（真正細菌）を細胞内に共生させている。これは、“生物界ドメインの異なる3者間共生”という興味深い研究対象であるものの、嫌気性纖毛虫を実験室内で培養することの困難さが、この3者間共生に関する研究を妨げる要因となっている。我々の研究室では、浄化槽より単離した *Trimyema* 属（トリミエマ）の嫌気性纖毛虫を人工培地で長期間に渡り培養することに成功しているが、この他に嫌気性纖毛虫で安定的な培養に成功した例は知られていない。そこで本研究では、*Trimyema* の培養成功例を参考に、沖縄県内の下水処理場（浄化センター）より処理水を採取し、その中に生息する嫌気性纖毛虫の培養を試みた。その結果、沖縄県内の浄化センターから、10–20 μm 程度の大きさの小型原虫培養株（GW7株）の取得に成功したので報告する。顕微鏡下における形態学的観察および18S rRNA遺伝子の分子系統解析の結果、今回得られたGW7株は嫌気性纖毛虫である *Cyclidium* 属（シクリディウム）の一種（以下、*Cyclidium* 原虫）であることが示された。

Cyclidium 原虫に関しては、1990年代にイギリスの研究者が、メタン生成アーキアおよび機能未知のバクテリアをその細胞内に共生させていることを報告しているが、それら共生微生物の系統学的知見は不明である。そこでまず、今回得られたGW7株にもメタン生成アーキアおよびバクテリアが共生しているか検証した。GW7株の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、原虫細胞内においてメタン生成アーキア特有のF420蛍光シグナルを検出したことから、GW7株が何らかのメタン生成アーキアを細胞内共生させていることが明らかとなった。また、共生バクテリアに関して16S rRNA遺伝子のクローン解析を行った結果、*Verrucomicrobia* 門に属するバクテリアが検出され、これがGW7株の共生バクテリアである可能性が示唆された。今後はマイクロマニピュレータを用いてGW7株のクローン化を行い、クローン培養株における共生メタン生成アーキアおよび共生バクテリアの系統学的位置や原虫細胞内での局在を詳細に検証する予定である。

辻田 有紀¹, 榎本 葉月¹, 木下 晃彦², 山下 由美³, 遊川 知久³¹佐賀大農, ²森林総研, ³国立科博植物園

多くの陸上植物は生活史を通じて菌根菌と共生関係を構築している。ラン科オニノヤガラは、種子発芽時には落葉分解菌のクヌギタケ属と共生する一方、成熟個体は木材腐朽菌のナラタケ属と共生することが報告されており、生活史の段階で共生する菌の種類が変化する非常に珍しい事例として知られている。しかし、発芽時の菌根菌相は、培養試験によって示された結果であり、自然生態系でどのような菌が発芽を誘導しているかは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、種子を袋につめて自生地に埋設し、定期的に回収して発芽の様子を観察する自生地播種試験法を用いて、オニノヤガラの発芽に関与する菌根菌相を解明し、幼若期から成熟期への移行に伴う菌パートナーの変化の有無を検証することを目的とした。オニノヤガラの自生地3地点（福島県、東京都、山梨県）において、完熟種子を採取し、ナイロンメッシュの種子袋を作製して、成熟個体の周辺に埋設した。その後、1～3年後に各地点より45～72個の種子袋を回収し、実体顕微鏡下で発芽の様子を観察した。発芽した実生は大きさにより3つのステージに分けてカウントした。また、得られた実生個体よりDNAを抽出し、菌に特異的なプライマーを用いてrDNA-ITS領域を増幅後、塩基配列を決定して既知の菌の配列と相同性検索を行うことで、菌根菌の系統的な帰属を特定した。福島および東京の自生地より1～3年後に回収したそれぞれ9および7個の種子袋内で発芽が見られた。ステージ2および3の個体について菌根菌を分子同定したところ、落葉分解菌のクヌギタケ属とシロホウライタケ属、外生菌根菌のイボタケ科や、ラン科の普遍的な菌根菌であるケラトバシディウム科が検出された。このことから、オニノヤガラの種子発芽は、多様な菌に誘導されることが明らかになった。一方、本調査では実生からナラタケ属が検出されず、東京の自生地の成熟個体からはナラタケ属が検出されたことから、オニノヤガラが幼若期にはクヌギタケ属の他にも様々な種類の菌と共生するものの、成熟にいたる過程でナラタケ属との共生ヘシフトすることが明らかになった。

升本 宙, 出川 洋介
筑波大・菅平

【背景】地衣類は菌類と藻類からなる複合生物として知られているが、近年、大型地衣類の地衣体は様々な微生物に生息場所を提供する微小環境の一つである“地衣圏（lichensphere）”として見なされ、注目を集めるようになってきた。菌類も“地衣圏”に生息する微生物の例外ではなく、地衣体を構成する菌類や藻類とは別の“第三者の菌類”が、地衣生菌や地衣内生菌、地衣表生菌として地衣体に生息することが知られている。本研究ではこれらを地衣生息菌と総称する。【方法】本研究では、2016年3月から6月にかけて長野県上田市菅平高原において2種の葉状地衣類（キウメノキゴケ *Flavoparmelia caperata* とツメゴケ属の一種 *Peltigera* sp.）を各3サンプルずつ採集し、地衣体の表面殺菌による地衣生息菌相の変化を調査した。採集した地衣類は、まず界面活性剤を含む滅菌水中で複数回攪拌して地衣体表面のごみをできるだけ取り除いた。その後、地衣体を 0.5 cm²程度の大きさに断片化し、断片を4区に等分した。うち1区は表面殺菌前の無処理区、残り3区はそれぞれ70% EtOH、0.5% NaOCl、20% H₂O₂ による表面殺菌処理区とした。各区あたり50断片を無作為に選出して麦芽寒天培地上に静置し、断片から伸展した菌糸を分離して菌株を確立した。各菌株は形態的特徴及びITS領域の塩基配列を用いて属または種レベルまで同定した。【結果】キウメノキゴケの場合、無処理区では全3サンプルで *Pestalotiopsis maculiformans* に近縁な1系統が多く分離された。表面殺菌処理区では、使用した薬剤に応じて70% EtOHでは複数系統の *Nemania* 属菌、0.5% NaOClでは *Biscogniauxia maritima*、20% H₂O₂ では *Sarea resinaea* がそれぞれ多く分離された。ツメゴケ属の一種の場合、無処理区では3サンプル中2サンプルで同じく *P. maculiformans* に近縁な1系統が最も多く分離された。表面殺菌処理区では、表面殺菌に使用した薬剤の種類にかかわらずクロサイワイタケ科菌類の複数属が多く分離された。【結論】表面殺菌前に多く分離された菌群は、表面殺菌に使用した薬剤の種類にかかわらず、表面殺菌処理によって全くあるいはほとんど分離されなくなり、地衣体の表面殺菌により分離される地衣生息菌相の構成が大幅に変化することが判明した。また、地衣類の種によっては、表面殺菌処理に使用した薬剤の種類がそこから分離される地衣生息菌相の構成に大きな影響を与えることが判明した。

山田 宗樹, 出川 洋介
筑波大・菅平

【背景】絶対寄生性生物は一般に培養が困難である。培養系が確立されていない場合、寄生機構や生活史に関する知見は野外観察に依存し、研究が遅れがちである。担子菌門サビキン亜門クリプトマイココラクス綱は2属2種のみが知られ、各種1例しか報告のない稀な菌類である。培養例はないものの、他菌と相互作用をすること、及び菌類への寄生構造とされる“コラコソーム”というオルガネラが知られる。従って、これらは絶対的な菌寄生菌の可能性が高いが、十分な検証例はなく、宿主菌類の正確な同定すらなされていない。本研究では、本綱の未記載種 *Cryptomycocolax* sp. について寄生構造を含めた観察を行い、宿主を解明、培養系を確立したので報告する。【材料と方法】長野県上田市菅平高原において動物糞上に発生した菌を採集、温室培養により維持した。担子胞子をMEYE培地に移植、単離を行った。また、同基質より分離した複数の菌類を宿主候補とし、単離した当該菌類の胞子と共に0.3%エビ培地に接種、共培養による培養系の確立を試みた。更に形態を光学顕微鏡、寄生部位の微細構造を透過型電子顕微鏡により、それぞれ観察した。【結果と考察】宿主候補として不完全菌類 *Acremonium* 様菌類2種、*Volutella* sp. および接合菌類 *Mucor hiemalis* を分離した。当該菌類は、単独培養及び不完全菌類との共培養では生育しなかった一方、*M. hiemalis* との共培養では胞子形成に至る生育を示し、継代による維持に成功、培養系の確立に至った。本種は菌糸にクランプを欠き、担子胞子は紡錘形-狭い涙形、また微細構造において“type 2”と称される特殊な形状のコラコソームでの宿主細胞壁への連絡が見られた。本綱の2属 (*Colacosiphon*・*Cryptomycocolax* 属) はクランプの有無、担子胞子の形態、type 2 コラコソームの有無で区別される。クランプを欠く点は前者と一致するが、胞子の形態およびtype 2コラコソームをもつ点は後者と一致、より近縁と考えられる。また既知種 *Cm. abnormis* とは担子器や担子胞子のサイズが異なる。従って、当該菌類は *Cryptomycocolax* 属の未記載種と判断した。本種は *M. hiemalis* との共培養時のみ生育、またコラコソームを介した相互作用が見られたことから、*M. hiemalis* への絶対的菌寄生菌と考えられる。担子菌門における接合菌類への寄生は本種が初報告であり、確立された培養系はその未知の寄生様式解明への寄与が期待される。

北出 理, 根本 まなみ
茨城大・理

[背景] シロアリの消化管内にはパラバサリア類・オキシモナス類に属する原生生物が群集を構成し、木質分解を通し宿主と緊密な共生関係をもっている。原生生物群集の種組成はシロアリの種に特異的である。北海道南部から大隅諸島にかけて分布し、生息域の温度差が大きいヤマトシロアリでも、種組成は地域によらず基本的に同一である。一方、原生生物各種の個体数や多様度は温度の影響を受けている可能性があるが、温度が消化管内微生物群集構造に与える影響は一般に不明である。本研究ではヤマトシロアリを異なる温度で飼育し、温度が原生生物の群集構造や多様性に影響を与えるかどうかを調べた。[方法] 野外コロニーから抽出したワーカー200個体を餌材とともにケースに入れ、4通りの温度（8℃、18℃、23℃、28℃）で、60日間全暗条件で飼育した。各温度条件とも5反復を設けた。その後、1コロニーあたり5個体のワーカーの消化管内容物を調べ、血球計算盤で14種の原生生物の個体数を算定した。また2つの野外コロニーについて、同様に各種原生生物の個体数を算定した。得られたデータから、原生生物の総個体数、種数、群集の均等度指数(J')を求めた。また、温度とシロアリの個体数が原生生物の種数と個体数に与える影響をポアソン回帰モデルによるモデル選択で検討した。さらに群集の類似性を主成分分析で、温度と生残個体数が群集組成に与える影響をPERMANOVAで調べた。[結果と考察] 60日後のシロアリの生存率は高温で下がる傾向があった。原生生物の平均総個体数は18℃で最小で、より低温あるいは高温で大きくなった。温度と生残宿主個体数は共に原生生物の個体数に影響を与えた。群集の多様性に関しては、原生生物の平均種数に温度と宿主個体数は影響しなかったが、均等度が低温で大きくなる明瞭な傾向が見られた。主成分分析による主成分得点のプロットで、28℃と8℃のコロニーは明瞭に他から分離された。さらにPERMANOVAの結果から、群集構造が温度により有意な影響を受ける ($P<0.001$) が示された。温度の原生生物の群集構造への影響は、群集構造や腸内代謝の季節変化を示唆する。一方で種組成が基本的に温度の影響を受けないことは、ヤマトシロアリの共生原生生物の種組成の広い分布域内の一様性に対応する。

大友 量, 岡 紀邦, 森本 晶
農研機構・北海道農業研究センター

【背景と目的】 アーバスキュラー菌根菌（以下AM菌、古くはVA菌根菌）は植物のリン酸吸収を促進することから土壌改良資材として政令指定されており、その機能を農業生産に活用することが期待されている。AM菌の機能・動態の解析を行う上で個別の菌株の性質を理解することが必要であり、農研機構ジーンバンクによるAM菌分離菌株の収集事業はそのような基礎研究を推進する上で重要である。AM菌は絶対共生性であり、また細菌におけるグリセロールストックのような半永久的な保存方法が確立していないため、宿主植物との共存培養による増殖を1-2年のサイクルで実施することが必要である。そのようにして増殖した菌株の純粋性の検定はこれまで分離胞子の形態観察をもとに実施してきたが、事業の効率的な実施の上ではより簡便・汎用的な確認手段を確立することが望ましい。そこで分離菌株の簡易同定にPCR-DGGEを活用することを試みた。【方法と結果】

2016年度に増殖したAM菌分離株（9属18種を含む46サンプル）の培養土壌400 mgからDNAを抽出し、AM菌の18S rRNA遺伝子を標的とする特異プライマーを用いてPCR-DGGEを行った。その結果、DGGEバンドの位置およびその配列から大半の株の系統的な違いを簡便に識別できることが確かめられた。また、一部の増幅効率が劣る分類群の菌株についても2段階PCRを行うことで識別が可能であり、本手法がAM菌分離菌株の簡易同定に有効であることが確認できた。Gigaspora属の複数の菌株ではGigaspora属特異的な位置のメインバンドに加えて複数のマイナーバンドが認められたが、それらの配列は系統樹上で全てGigaspora属のクレードに属した。またそれらのマイナーバンドのパターンが菌株によって異なったことから、この手法は同じ分類群に属する別の菌株の識別手段としても利用可能な場合があることが示唆された。

本荘 雅宏¹, 鈴木 研志², 西村 朋香³, 田代 陽介¹, 二又 裕之^{1, 4}¹ 静大院・総合科技, ² 静大院・自然科学教育部, ³ 静大・工, ⁴ 静大・グリーン研

微生物生態系における微生物群集の動態を理解するためには、微生物間相互作用の理解が必要不可欠である。一般環境細菌 *Pseudomonas* sp. C8株の培養上清は、異属微生物の増殖を著しく抑制することが示されている。即ち、増殖速度と最大増殖量の低下および誘導期の遅延であり、完全に死滅する結果は得られていない。この様に、C8株由来増殖抑制物質に対する増殖応答に関する概略が見えてきたのみであり、その作用機序については全くの不明である。そこで本研究では、C8株培養上清に対する *Escherichia coli* BW25113株の応答から、作用機序に関する知見を得ることを目的とした。フェノールを唯一の炭素源とする培地でC8株を連続集積培養し、時系列毎に上清を回収し、BW25113株を用いて増殖抑制能の有無を確認した。グルコースを唯一の炭素源とする最小培地でBW25113株を培養し、上清を50%(v/v)添加した系および無添加系で増殖特性を比較した。その結果、両系においてグルコース完全消費されたにも関わらず、添加系における増殖量および増殖速度定数は無添加系の約70%および50%以下であった。グルコース消費に伴う酸素消費速度ならびにATP生産量を時系列で比較した結果、添加の有無に関わらずほぼ同等の傾向を示した。脱共役剤CCCP添加系ではATP生産が完全に抑制されたことから、本増殖抑制物質は脱共役的作用を生じるのではなく、細胞内の代謝に直接影響していることが推察された。そこで、どの代謝に影響しているのかを調べるため、BW25113株一遺伝子欠損コレクション3285株を用いて、増殖抑制に関与する遺伝子の推測を増殖曲線の測定により行った。一次スクリーニングの結果107株が増殖抑制を示さず、その内24株はグリコール酸パーミアーゼやカチオン排出ポンプなどの膜輸送タンパクあるいは排出ポンプ欠損株であった。以上の結果から、C8株由来増殖抑制物質は、同化プロセスに必要なエネルギーを特異的に排出系の代謝エネルギーとして利用させ、結果的に増殖抑制を誘発していると推定された。

高木 航太郎, 長谷川 雄将, 二又 裕之, 田代 陽介
静大院・総合科技

【背景】 微生物は各々に独自の特性や手段を用いて、環境中の周囲の細胞と複雑に相互作用している。この一例として、細菌が細胞外に分泌するリボソーム様構造体Membrane Vesicles (MVs) が挙げられる。MVs内腔または表層には供与菌由来の物質が保持されているため、分泌されたMVsが周囲の他の細胞に取り込まれることで細胞間の物質の受け渡しが達成される。我々はこれまで、*Buttiauxella agrestis*由来のMVsが同属菌株の細胞を標的として選択的に作用すること、さらにはこの性質が菌体の表面電位に大きく起因していることを明らかにした。*Buttiauxella*属細菌はこの様に属選択的な物質送達の媒体としてMVsを利用することで、同属間での活発なコミュニケーションを可能にしていると考えられ、このことは微生物細胞がMVsを介した物質の長距離移動を戦略的に利用していることを示唆している。しかしながら微生物細胞によるMVsの取り込みに関しての知見は未だに少なく、その関連因子や機構については明らかになっていない。そこで本研究では、微生物細胞によるMVs取り込み現象に関与する因子の探索を目的とした。

【方法】 本研究では、高いMVs生産能を示す*B. agrestis* CUETM77-167をモデル微生物として用いることとした。まず当菌株由来のMVsを抽出・精製し、SDS-PAGEにより保持タンパク質の分離・同定を行った。同定したタンパク質のうち5種を選定し、これらをコードする遺伝子の欠損株を作製した。これら欠損株及び野生株をMVs受容菌とし、蛍光試薬FM4-64で標識したMVsと30 °C, 30 min反応させた。菌体の蛍光強度によりMVsとの結合量を定量し、これを各受容菌のMVs取り込み能として評価した。

【結果】 5種の遺伝子欠損株で野生株とのMVs取り込み能の比較を行ったところ、ペリプラズム空間に局在するTolBの欠損株においてMVs取り込み能の向上が確認された。さらに*tolB*欠損株由来のMVsを用いて同様に各受容株のMVs取り込み量の定量を行なったところ、*tolB*欠損株を受容菌とした場合にさらなるMVs取り込み能の向上が見られた。これらの結果から、TolBがMVs取り込みに関与していることが明らかになった。現段階では菌体表面の表現型の変化に起因する直接的影響、あるいは遺伝子発現や代謝経路の切り替えに起因する間接的影響の2通りの関与が考えられ、MVs取り込みの動態の可視化によって詳細な機構及びTolBの作用機序の解明が期待される。

白川 誠¹, 上原 巖², 田中 恵²¹東京農大・院農学, ²東京農大・地域環境

植物根圏に生息するバクテリアは、非根圏土壌とは異なる特異的な群集を形成すると共に、宿主植物や植物と共生する菌根菌に対して、病害菌の抑制や菌根形成の促進などの影響を及ぼすことから、その群集構造や生態、相互作用について明らかにすることが重要である。

こうしたバクテリア群集が形成される要因として、発表者らは先行研究においてマツ科やブナ科の樹木などと共生関係を結ぶ外生菌根菌（EMF）による影響に着目し、外生菌根性樹種であるアカマツ *Pinus densiflora* を対象に根圏バクテリア群集の把握と、根圏由来バクテリア及びEMFを用いた二員培養試験を行った。その結果、アカマツ根圏（菌根・EMF未感染根端）のバクテリア群集では *Burkholderia* 属、*Rhizobium* 属といったグラム陰性のバクテリアによる優占が確認された。また、二員培養試験ではEMFが非根圏土壌に優占する *Bacillus* 属に対して抗バクテリア活性を示す傾向が確認された。両試験の結果から、EMFによる根圏バクテリア群集形成への関与が示唆された。しかしながら、アカマツ根圏ではEMFに未感染の根端においても、菌根におけるバクテリア群集と類似したものを示すことが確認されており、EMFによる影響の他にも根圏バクテリア群集を決定する要因が働いていることが考えられる。そこで発表者らは、EMF以外の群集決定要因として、菌根と未感染根端に共通する要素である宿主根からの滲出物に焦点を当てた。

植物の根からの滲出物としては、光合成由来の糖分や有機酸などの水溶性滲出物の他に、酸性多糖を主成分とする粘性滲出物（ムシゲル）が知られている。粘性滲出物は根の水分や無機塩類の吸収能促進、根冠の保護などの機能が示唆されているが、バクテリアの根圏への定着に及ぼす影響については未だ十分に明らかになっていない。また、樹木においては有機酸をはじめとする水溶性滲出物に比べて粘性滲出物に焦点を当てた研究例は極めて少ない。

本研究では根の滲出物の内、特に粘性滲出物に着目し、アカマツにおける粘性滲出物の採取・分析方法の検討を行う。加えて、根圏バクテリアの優占部位の差異と粘性滲出物に対する応答（資化性など）との関連について、非根圏土壌及び根圏由来のバクテリアを用いて比較することで、粘性滲出物が根圏バクテリア群集決定要因になり得るか検討した。

今野 勇希¹, 高橋 智子¹, 今道 仁¹, 梶原 聖也², 根本 智行², 菅原 雅之¹, 南澤 究¹
¹東北大・院生命, ²石巻専修大・理工

【背景・目的】 *Rj2* 優性遺伝型ダイズは、根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110株の感染により根粒を形成するが、近縁のUSDA 122株とは共生不和合性を起こす。*Rj2*遺伝型は1つの抵抗性Rタンパク質により決定されており(Yang *et al.* 2010)、この共生不和合性は宿主防御応答が誘導されることに因ると考えられている (Benjamin *et al.* 2015)。一方で我々は、不和合性を誘導する根粒菌因子として 3型分泌エフェクターNopPを同定した (Sugawara *et al.*未発表)。*nopP*遺伝子はダイズ根粒菌に広く分布しており、その特定のアミノ酸配列パターンを保有する菌株が*Rj2*共生不和合性を示すこともわかってきた。本研究では、①ダイズ以外を宿主とする*Bradyrhizobium*属根粒菌の*nopP*の有無と多様性、および②*Rj2*ダイズの共生不和合性を引き起こす防御応答機構を明らかにすることを目的とした。【方法】 *B. diazoefficiens*USDA110のNopPアミノ酸配列をQueryとしてBLAST検索を行い、identity 70%以上のNopPが認められた*Bradyrhizobium*属根粒菌株を対象に、*nopP*、*nifH*および16S rRNAの塩基配列に基づく系統樹を作成した。また、宮城県各地から収集した*Bradyrhizobium*属ハギ根粒菌のドラフトゲノムを決定し、上記遺伝子配列に関してダイズ根粒菌と比較した。*Rj2*ダイズの共生不和合性にかかる防御応答機構について、USDA122株及び*nopP*破壊株をそれぞれ接種したダイズ根における遺伝子発現プロファイルを調べた。【結果・考察】 *nopP*の多様性を調査した結果、ダイズ根粒菌では*B. japonicum*や*B. diazoefficiens*を含むグループと*B. elkanii*のグループに分かれた。ヤブマメを宿主とするth.b2株のゲノム上にも*nopP*は存在していたが、ダイズ根粒菌とは異なるクレードに属していた。16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹と*nopP*系統樹は異なっていた。以上の結果から、*nopP*遺伝子は系統とは独立して宿主植物との親和性に合わせた進化を遂げている可能性が示唆された。本発表では、ハギ根粒菌の比較解析と宿主防御応答についても報告する。

今道 仁, 菅原 雅之, 岩野 裕也, 佐藤 修正, 三井 久幸, 南澤 究
東北大・生命

【背景・目的】ダイズは根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens*と共生するが、*Rj2*遺伝型ダイズは*B. diazoefficiens* USDA122株との共生が成立しない(Caldwell 1966)。Yangら(2010)はTIR-NBS-LRR型の病原抵抗性Rタンパク質をコードする遺伝子Glyma16g33780を宿主*Rj2*遺伝子として同定し、2アミノ酸残基(452/490番目)の相違により*Rj2*遺伝型が決定されていることを報告した。Tsukuiら(2013)は、USDA122株のIII型タンパク質分泌系(T3SS)が、*Rj2*ダイズ品種Hardeeとの共生不和合性を誘導していることを明らかにした。さらに我々はUSDA122株のBD122_09010遺伝子産物(以下エフェクター)が、Hardeeとの共生不全を誘導するT3SSエフェクターであることを明らかにした。本研究では、USDA122株のT3SSエフェクターと*Rj2*タンパク質の相互作用についてYeast two hybrid (Y2H)法で検討した。

【方法】Y2H法は、二つのタンパク質の直接的な相互作用を酵母の栄養要求性に基づく生育により評価する方法である。Hardee (*Rj2*)とLee (*rj2*)のRタンパク質遺伝子cDNA断片、及びUSDA122とUSDA110のエフェクター遺伝子をPCRにより増幅し、Y2H法のbait, preyとなる形質転換用プラスミドにそれぞれ導入した。その後preyとbaitの組み合わせを変えた形質転換酵母を作製し、生育試験を行った。

【結果・考察】baitとして*Rj2*タンパク質、preyとしてエフェクターを導入した形質転換酵母では、すべての組み合わせにおいて相互作用は検出されなかった。一方、baitとしてUSDA122型エフェクターを導入した酵母ではレポーター遺伝子が自己活性化され、本エフェクターのY2H法による相互作用解析は困難であることが分かった。しかし、全273アミノ酸残基中4残基のみが異なるUSDA110型エフェクターをbaitにした場合には、同様の自己活性化が認められず、*Rj2*ダイズへの機能が異なる両エフェクター高次構造が異なることも考えられた。今後は、エフェクターとRタンパク質を精製し、直接相互作用や結晶構造の解析を行う予定である。

郭 永¹, 小沼 奈那美², 高島 勇介^{1, 3}, Dilruba Sharmin¹, 佐藤 嘉則⁴, 成澤 才彦^{1, 2, 3}, 真鍋 理一郎⁵, 高島 昌子⁵,
大熊 盛也⁵, 太田 寛行^{1, 2, 3}, 西澤 智康^{1, 2, 3}

¹茨城大・農, ²茨城大院・農, ³東京農工大・連合, ⁴東京文化財, ⁵理研・微生物材料開発室

Endosymbiotic bacteria have been identified in diverse fungi, including members in Ascomycota, Basidiomycota, and Mucoromycota that inhabit soils and plants. The presence/absence of endohyphal bacteria (EHB) alters host morphology, sporulation, metabolite production, and other properties. Current studies revealed that an EHB *Mycoavidus cysteinexigens* B1-EB^T in the hyphae of soil fungus *Mortierella elongata* FMR23-6 I-B1 lacks several key genes for cysteine biosynthesis, suggesting a potential cysteine-dependence for its host. In this study, therefore, we examined the effect of *M. cysteinexigens* B1-EB^T on substrate use by its host, through comparing respiratory activity between EHB-harbored and cured fungal isolates across 95 carbon sources with a Biolog FF MicroPlate. ANOVA analysis indicated that *M. cysteinexigens* B1-EB^T-harbored fungal isolate significantly outperformed the cured isolate on 68 carbon sources including 23 saccharides, 12 carboxylic acids, 11 amino acids, 9 sugar alcohols, 4 amides, 2 methyl sugars, and other 7 organic compounds. This result suggests that *M. cysteinexigens* B1-EB^T enhances carbon source use by its fungal host, which implies that the endosymbionts improves the host accessibility to carbon sources in oligotrophic environments such as soils. To explore such difference in carbon metabolism, the genome analysis of EHB and fungal host is in progress.

山田 倫子¹, 濱田 雅東¹, 中鉢 淳^{1, 2}¹豊橋技科大院・工・環境生命工, ²豊橋技科大・EIIIRIS

ミカンキジラミ *Diaphorina citri* (半翅目・キジラミ上科) は、カンキツグリーニング病の媒介により柑橘類に致命的な被害を与える、世界的に重要な農業害虫である。本種は腹部体腔内に共生器官「bacteriome」を持ち、2種のオルガネラ様共生細菌 *Candidatus Proffttella armatura* (*Betaproteobacteria*) および *Ca. Carsonella ruddii* (*Gammaproteobacteria*) を収納する。当研究室は、*Proffttella* が産生し、*D. citri* 体内に10 mM以上の高濃度で蓄積する新規ポリケチド「ディアフォリン」を発見した。ディアフォリンは、ラットB104細胞やヒトHeLa細胞といった癌細胞株に毒性を示し、宿主昆虫を天敵から守る防衛毒と目される一方、創薬シード化合物としての応用利用も期待される。

そこで今回は、昆虫病原性微生物や捕食者などの天敵を用いた *D. citri* の生物学的防除や、ヒトの医薬開発といった応用展開の基盤データを得ることを目的とし、細菌 (*Escherichia coli* JM109株)、真菌 (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741株)、昆虫細胞 (ヨトウガ *Spodoptera frugiperda* 由来 Sf9 細胞株)、昆虫生体 (*D. citri* に近縁で *Proffttella* を持たないエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* および *D. citri* の捕食者ナミテントウ *Harmonia axyridis*)、さらに肺癌7系、胃癌6系、大腸癌5系、卵巣癌5系、脳腫瘍6系、乳癌5系、腎癌2系、前立腺癌2系、メラノーマ1系の計39系よりなるヒト培養癌細胞パネルを用い、ディアフォリンの生物活性評価を行なった。

その結果、*E. coli* を除くすべての材料でディアフォリンの顕著な毒性が認められた。その感受性は、すべてのヒト癌細胞、昆虫 Sf9 細胞、*A. pisum* 生体で高く (10 μ M 未満で有効)、*S. cerevisiae* や *H. axyridis* 生体で低かった (1 mM 以上で有効)。天敵昆虫での低感受性は興味深く、生物学的防除の際に考慮すべき知見と言える。今後は創薬に対する有望性の判断を目指し、ヒト正常細胞を用いた活性評価を進める。

山本 航平¹, 片桐 知之², 佐藤 匠³, 山田 明義⁴¹栃木県博, ²服部研, ³広島大・院理学, ⁴信州大・農学

2011年, 祖先的苔類であるコマチゴケ綱の数種が, ケカビ亜門菌類と特異的に関係を有すると報じられた。植物と菌類の相互作用系の出現を経て, 菌根共生系が進化した過程を解明するうえで, 陸上植物の最基部系統であるコマチゴケ綱の菌根様構造の形態や機能を明らかにすることは意義深い。しかし, 同綱の中でもコマチゴケ属とトロイブゴケ属の数種について, ケカビ亜門が形成した菌根様構造の観察事例があるのみで, ヒメトロイブゴケ属については未調査であり, 祖先的苔類と菌類の関係の網羅的な解明には至っていない。また, コマチゴケ綱苔類の多くがオセアニアに分布中心を持つが, ヒメトロイブゴケ属はユーラシア大陸および北アメリカ大陸の亜高山帯に分布中心を持ち, 後者が特異な菌類と関係する可能性もある。本研究では, ヒメトロイブゴケ属の菌根様構造の形態観察とそこに生息する菌類の分子同定を行い, 他のコマチゴケ綱苔類と比較することを目的とした。

2016年5月に山梨県南アルプス市甲斐駒ヶ岳の亜高山帯で採集されたヒメトロイブゴケの配偶体(11個)について切片を作成し顕微鏡観察した結果, 茎部に菌根様構造が形成されていた。コマチゴケ綱以外の多くの苔類では, 内生菌の菌糸が最初に仮根に侵入し配偶体内部へと侵入・定着していくが, 本種では配偶体腹面の表皮細胞間隙から菌糸が侵入し配偶体内部に定着していた。配偶体内部の中肋の腹面付近では, 菌糸が宿主植物細胞内に侵入し, 菌糸先端は膨張していた。この菌糸膨張は, コマチゴケ属やトロイブゴケ属の細胞内に侵入したケカビ亜門の菌糸が示す構造と類似した。一方, 中肋の中心部付近では, 菌糸は宿主細胞間隙には定着しているものの細胞内には侵入していなかった。このように, ヒメトロイブゴケ配偶体の部位によって菌糸の定着・侵入様式が異なる点は, トロイブゴケ属におけるケカビ亜門の菌糸の定着・侵入様式と共通していた。核遺伝子の複数領域を用いた分子同定の結果, ヒメトロイブゴケに定着していた菌糸はケカビ亜門のアツギケカビ目に属する*Endogone corticioides*と同定された。これは苔類で見られる菌根様構造の形成に関与するケカビ亜門の既知種が同定された初の事例である。今後, ヒメトロイブゴケと*E. corticioides*の相互作用系を確立し, その機能を菌根共生系と比較する必要がある。

Dilruba Sharmin, Guo Yong, Nishizawa Tomoyasu, Narisawa Kazuhiko, Ohta Hiroyuki
Ibaraki University College of Agriculture

Mycoavidus cysteinexigens B1-EB was newly described as an endohyphal bacterium (EHB) of the soil fungus *Mortierella elongata* from Japanese soil. Its genome sequence was reported in our prior publication. Recently, metagenome sequencing was reported for *M. elongata* AG77 together with its EHB (Mc-AG77) from soil in USA. In this study, we compared the genomes of B1-EB and Mc-AG77 using the well-studied EHB, *Burkholderia rhizoxinica* HKI454 of the fungus *Rhizopus microsporus*, as the reference. The genome of Mc-AG77 (2.63M bp) represents very high similarity with that of B1-EB (2.79M bp) and the both are clearly reduced than that of HKI454 (3.75M bp). Despite of different host fungi, the alignment of amino acid sequences showed that the HKI454 genome consists of 1265 and 1221 ortholog clusters with those of B1-EB and Mc-AG77, respectively. Comparing the identity of amino acid sequences of these ortholog clusters, HKI454 is closer to Mc-AG77 than B1-EB, suggesting genomic variation probably due to geographic difference, USA vs Japan. Although the B1-EB and Mc-AG77 genomes lack chitinolytic enzymes responsible for invasion into fungal cells, they comprise several predicted toxin-antitoxin systems including insecticidal toxin complex *RelE/StbE*, *HipA*, *MazF*, and PIN domain imposing an addiction-like mechanism essential for the endophytic growth control during host colonization.

高橋 智子, 菅原 雅之, 三井 久幸, 南澤 究
東北大・院生命

【背景と目的】根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122は、*Rj2*優性遺伝型を持つダイズに根粒を形成しない共生不和合性を示し、その原因は3型分泌エフェクターNopPの特異的なアミノ酸置換であることが菅原らによって明らかになった。一方、NopPは和合性を示す*B. diazoefficiens* USDA110からも分泌され、根粒菌にのみ見いだされるエフェクターであることから、マメ科植物との共生関係において積極的な役割を担っている可能性がある。本研究では*nopP*遺伝子の多様性と、NopPタンパク質のアミノ酸配列の違いが宿主特異性に及ぼす影響について検討し、根粒共生系におけるNopPの役割について考察した。

【方法】*nopP*遺伝子の多様性を検討するため、NCBI BLASTと、日本各地から分離した33株のダイズ根粒菌を対象としたサンガーシーケンスおよびMiSeqによるドラフトゲノム解析を行った。また、供試した株のNopP配列パターンごとに数株ずつ選び、*Rj2*ダイズHardeeに接種してその根粒形成と窒素固定の表現型を調べた。また、*nopP*遺伝子変異株をダイズ以外のマメ科植物に接種し、その表現型を調べた。

【結果と考察】*nopP*遺伝子は調査した33株全てから見いだされ、共生窒素固定を担う*nif*遺伝子群上に共通して位置していた。また、NopPアミノ酸配列における変異箇所は限定されており、*Rj2*ダイズに対する和合性と不和合性に関与するとされる4か所のアミノ酸残基に注目すると、その配列は8パターンに集約していた。8パターンのNopPアミノ酸配列にはUSDA110型とUSDA122型に加え、アミノ酸残基の一部が置換したもの、挿入配列を含むものなどが見られた。接種試験の結果、供試した株から見いだされた全8パターンのNopPアミノ酸配列うちUSDA122型を含む2パターンを保有する根粒菌株は*Rj2*ダイズに対する不和合性を示し、残りの6パターンの株はすべて和合性を示した。以上の結果より、*Rj2*ダイズに不和合性を示すNopPの配列パターンは限定されていた。また、マングビーンを使用した接種試験の結果、複数の系統がUSDA122型NopPを原因とする共生不和合性を示したことから、ダイズ以外のマメ科植物にも*Rj2*ダイズと同様なNopPを介した応答機構が存在することが推測された。

池田 直也¹, 藤上 雅也¹, 壇 勲興¹, 中鉢 淳^{1, 2}¹豊橋技科大院・工・環境生命工, ²豊橋技科大・EIRIS

ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*, 昆虫綱: 半翅目) は、カンキツグリーニング病の媒介によりかんきつ類に致命的な被害を与える、世界的に重要な農業害虫である。本種は腹部体腔内に共生専用の器官「バクテリオーム (bacteriome)」を持ち、その外層を構成する単核の「菌細胞 (bacteriocyte)」内に *Candidatus Carsonella ruddii* (*Gammaproteobacteria*)、中央の多核細胞内に *Ca. Profftella armatura* (*Betaproteobacteria*) を収納する。いずれの共生細菌も親から子へと垂直感染により永続的に受け継がれ、その過程でゲノムが大幅に縮小するなど、オルガネラを想起させる性質を示すが、*Carsonella* が典型的な「栄養共生体」である一方、*Profftella* は他に類例のない、オルガネラ様「防衛共生体」であることが示唆されている。今回は、このユニークな複合共生系の基盤データを得るため、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いて、垂直感染時とその後の胚発生過程における共生細菌の局在・形態等の変化を観察した。その結果、共生細菌2種は、成虫のバクテリオーム内で、通常のコブ状からごく短い棒状の形態に変化した後、両者がモザイク状・球状に集合して塊を形成し、卵黄形成期の卵母細胞の後極側から侵入することが明らかとなった。このモザイク状配置は、産卵後0-12時間 (28°C) の胚では維持されるが、胚帯の形成される産卵後12-24時間になると、*Carsonella* は塊の中心へ、*Profftella* は塊の辺縁部へ移動・分離した。また、この頃 *Carsonella* の形態が短い棒状からコブ状へと変化した。産卵後24-48時間では、宿主単核細胞の集塊が形成され、*Profftella* はこの中に、*Carsonella* は集塊に付着する多核領域に局在した。*Carsonella* を収納するこの多核領域は、産卵後48-72時間に、複数の単核細胞へと分かれた。さらに産卵後72-96時間では、*Profftella* が局在する細胞が多核細胞へと融合し、その細胞表面を覆うように *Carsonella* を収納する細胞が移動した。孵化後の1齢幼虫では、成虫同様のバクテリオーム構造、共生細菌配置となった。

藤上 雅也¹, 梶嶋 克哉², 中鉢 淳^{1, 3}¹豊橋技科大院・工・環境生命工, ²浜松医大・細胞分子解剖, ³豊橋技科大・EIIIRIS

【背景・目的】ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) は、柑橘類の不治の病であるカンキツグリーニング病を媒介する世界的に重要な農業害虫である。本種は腹部体腔内に、共生器官「バクテリオーム (bacteriome)」を持ち、その外層を構成する単核の「菌細胞 (bacteriocyte)」内に栄養共生細菌 *Candidatus Carsonella ruddii* (*Gammaproteobacteria*)、中央の内腔に相当する多核細胞内に、他に類例を見ないオルガネラ様防衛共生細菌 *Ca. Profftella armatura* (*Betaproteobacteria*) を収納する。*Profftella*が産生し、ミカンキジラミ体内に高濃度で蓄積する新規ポリケチド「ディアフォリン」は、各種真核生物に毒性を示し、捕食性・捕食寄生性の動物や昆虫病原性真菌などに対する防御機能が想定される。ただしその局在は全く不明であり、ディアフォリンの真の標的や、発生ステージ毎の機能、ディアフォリン毒性への宿主の対処策の理解を妨げている。この問題を解決するため、本研究では二次元位置情報を保ったまま質量分析を行なう「質量顕微鏡法」を用いて、ディアフォリンの局在を解析した。【方法】各発生段階のキジラミを液体窒素中で4% CMC (カルボキシメチルセルロース) に包埋して導電性テープを貼り、クライオスタットにて切片を作成した。う得られた切片は導電性両面テープにてITO (indium-tin-oxide) コートスライドガラスに固定した。マトリックス溶液 (40mg/mL 2,5-ジヒドロキシ安息香酸、50%メタノール、125mM硫酸アンモニウム) を試料上に噴霧して均一な微細結晶を形成させ、Solarix XR (BRUKER) を用いてMALDI-FTMS (Matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier-transform mass spectrometry) 法により、ディアフォリンの局在を解析した。イメージングには専用ソフトウェアflexImagingを使用した。【結果】ディアフォリンのm/z理論値484.2517に対応する484.2513のピーク ($\Delta m = -0.83$ ppm) が検出され、ディアフォリンが幼虫の虫体全体に分布する傾向が見られた。

佐野 友紀¹, 木原 稔², 堀 知行³, 曾根 輝雄¹, 菊池 義智^{1, 4}, 伊藤 英臣⁴¹北大・院農, ²東海大・生物, ³産総研・環境管理, ⁴産総研・生物プロセス

水生生物の体表面は、水中に生息する細菌の定着場所であると同時に、病原体による攻撃の場ともなりうる。通常、それら水生生物はその体表面に抗菌物質を分泌し、これによって病原体の感染リスクを低減させていると考えられてきた。しかし近年、カエルやヒドラなどの水生生物の体表面には、病原体に拮抗作用をもつ特異的な細菌が生息していることが明らかとなってきた。水中に産下される水生生物の卵の表面も、体表面と同様に細菌の定着および病原体による攻撃の場となりうると考えられるが、現在のところ水生生物の卵表面の細菌叢に着目した研究はほとんどない。飼育・繁殖が容易でゲノム編集も可能な優れたモデル生物であるメダカは、体外受精を行い、受精後の卵はそのまま水中で発生が進む。受精卵は糖タンパク質が重層化した卵膜に覆われており、ここに細菌が定着して細菌叢を形成する。これらのことから、メダカの受精卵は卵の細菌叢の動態や機能解析に適したモデルになると考えられる。そこで本研究では、メダカ卵表面の細菌叢に着目し、細菌叢の伝達経路や胚発生期における動態、さらには宿主卵に対する機能を明らかにすることを目的とした。受精卵を採取するとともに、メス親個体の糞と飼育水を回収しそれぞれの細菌叢を比較解析した。その結果、受精卵表面の細菌叢は親個体の糞や飼育水中の細菌叢と大きく異なっていた。メス親個体の卵巣においては細菌が全く検出されなかったことを考えると、卵表面に生息する細菌は産卵後、外環境から選択的に移行し定着するものと考えられる。次に、受精直後から孵化直前まで経時的に卵を回収して細菌叢の動態を調べたところ、受精直後から受精1日目までは大きく変動する一方、眼が形成される受精3日目以降は細菌叢の構造変動が見られなくなった。また興味深いことに、ヒドラの体表面に定着して病原体への抵抗性に寄与することが知られているAcidovorax属やPseudomonas属細菌が胚発生期を通してメダカ受精卵から検出された。そこで、メダカ受精卵から細菌とカビを単離培養して、単離した細菌の抗カビ活性を調べたところ、カビの成長を阻害するPseudomonas属細菌が見つかった。以上の結果から、病原体の感染リスクが高い体外環境においても安全に胚発生を進めるために、水生生物は環境中の細菌を選択的に取り入れて利用している可能性があると考えられた。

猪瀬 有美¹, 郭 永², 高島 勇介^{2,3}, 坂上 伸生², 渡邊 真紀子⁴, 成澤 才彦²¹茨城大・院農, ²茨城大・農, ³東京農工大院・連合農学, ⁴首都大・都市環境

福島県南会津町および昭和村の境界付近に位置する駒止湿原では、開墾により失われたブナ林の回復を目的とし、植生分布、遷移および地形などの調査に基づき2000年よりブナ苗の植樹が試みられてきた。しかし、植樹された一部のブナは枯死あるいは生長が良好ではなく、植生回復には至っていない区域も認められる。

2016年度には、ブナと外生菌根菌の関係に着目し、ブナ林と開墾跡地を含む調査区を設け、外生菌根菌の菌種やその多様性の調査を行った。これまでに35種類の形態型が観察され、そのうち29種類については、菌類ITS領域に基づく分子同定ができた。また、調査区における土壌コア内の菌根片総数、ブナ実生根部の菌根形成率および出現形態型数はブナ林側から放棄地側へ向かって減少する傾向が見られた。以上より、放棄地側では外生菌根菌バイオマスが少なく、その多様性が低いためにブナ植生回復の障害となっていることが示唆された。また、外生菌根菌種を同定する際、内生菌が検出される例があったことから、ブナ実生の生育は内生菌による影響も受けている可能性が考えられる。

そこで、本研究では、ブナ実生の生育に関わる菌類相を明らかにし、ブナ林回復を実現するため、ブナ実生根部から菌類の分離を試みた。菌根35片および非菌根23片を供試し、MNC培地を用いて菌類の分離を行った。合計44菌株を分離し、ITS1FおよびITS4プライマーセットを用いたPCRおよび塩基配列決定後、BLAST相同性検索を行った。これまでに29菌株について結果が得られており、菌根片から分離した菌株のうち約9%が外生菌根菌として報告のある *Cenococcum geophilum* であった。これら菌株は昨年度に菌根片から検出されたものとITS配列が一致していた。また、菌根片から分離した菌株約27%が、内生菌として知られる *Phialocephala* 属菌を含む *Helotiales* 目に属する菌または *Oidiodendron* 属菌であった。そのうち、*Oidiodendron* 属菌については、昨年度に菌根片から検出されたものとITS配列が一致していた。一方、非菌根片からは菌根菌等は分離されなかった。

今回の結果より、駒止湿原のブナ実生には外生菌根菌に加えて *Helotiales* 目菌類や *Oidiodendron* 属菌が定着していることが明らかになった。これらの菌類はブナ実生の生育に関わると考えられるため、今後、分離された菌株を用いて、ブナ－外生菌根菌－内生菌の三者関係がブナ実生の生育に与える影響を調査していく予定である。

吉野 花奈美, 小室 晴香, 土肥 博史, 坂本 一憲
千葉大・院園芸

陸上植物と根圏微生物が相互に認識し、共生または寄生関係に進展していく過程では、様々なシグナル物質の利用が知られている。例えば植物は、根からストリゴラクトンやフラボノイド類を分泌し、アーバスキュラー菌根菌や根粒菌といった共生パートナーから認識される。このような認識シグナル物質として機能する植物根外分泌物質は、共生・寄生関係の始まりに重要である。陸上での共生関係は、真菌類とシアノバクテリアや緑藻との間にも広く存在し、地衣類という共生体を形成している。地衣類においても共生開始前に認識シグナル物質が存在することが示唆されているが、その物質の特定には至っていない。そのため、シアノバクテリアから緑藻、植物へと繋がる進化の過程で、類似の細胞外分泌物質が生物間相互作用に利用されている可能性は否定できない。そこで本研究では、緑藻と植物の放出する認識シグナル物質の共通性を検討するため、地衣類となる緑藻が分離培養下で特定の細胞外物質を分泌すると仮定し、地衣類における認識シグナル物質の候補を抽出することを目的とした。地衣類となる緑藻はトレボウクシア藻綱 (Trebouxiophyceae) に属すトレボウクシア (*Trebouxia*) が最も普遍的に存在している。本実験では採取したカラタチゴケ (*Ramalina conduplicans*) やヒロハツメゴケ (*Peltigera aphthosa*) などの地衣類から、*Trebouxia*や同じくトレボウクシア藻綱に属す *Coccomyxa*などの緑藻を分離し、さらに自由生活性の緑藻も対照区として単離した。これら緑藻株は核リボソームRNA遺伝子ITS領域の塩基配列を解析し、属または種を同定した。それぞれの緑藻株を振とう培養し、緑藻細胞を取り除いた培養液をTLC分析およびNMR解析に供した。その結果、地衣類となる緑藻3属3種3株のすべての培養液において、有機物と推測される複数の化合物がTLC上に確認できた。また培養液から抽出した親油性抽出物の¹H NMRスペクトルを測定した結果、芳香族化合物由来と推定されるものを含む複数のピークが観測された。すべての株の培養液から得られた抽出物において同様のピークが観測されたことから、地衣類となる緑藻が共通する構造を持つ化合物を細胞外へ分泌する可能性が示唆された。本発表ではこれらの化合物に関する詳細と自由生活性の緑藻が放出する細胞外物質との比較も合わせて報告し、植物が根圏に分泌する細胞外物質との共通性についても考察する。

諏佐 勇磨¹, 黒沢 正治¹, 豊福 雅典², 尾花 望², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・生命環境系

細菌はメンブレンベシクル(MV)と呼ばれる膜小胞を形成する。MVは細胞内に存在する様々な物質を内包しており、このMVが周囲の細胞に付着・融合することでそれらの物質を輸送し、様々な作用に寄与していると考えられている。例えば、グラム陰性細菌である緑膿菌のMVは、緑膿菌において用いられるシグナル物質であるPQS、核酸であるDNA・RNAおよび病原因子を含み、細胞間コミュニケーションや遺伝子水平伝播、病原性に寄与する。MVを介した物質輸送機構にはMVの形成、伝播、付着・融合の過程があり、形成メカニズムに関してはいくつかモデルが提唱されているが、付着・融合に関わる因子や詳細なメカニズムは明らかになっていない。これらが明らかになれば、上記のような微生物間、宿主間の相互作用を制御できる可能性がある。グラム陰性細菌の外膜には、菌体や基質への付着因子であるリポ多糖(LPS)が存在し、生体膜に由来するMVにはLPSが含まれることが示されている。特に緑膿菌外膜にはO抗原が異なる2種類のLPS(A band、B band)が存在するが、通常MVに含まれるLPSの割合は菌体と異なり、ほとんどがB bandであることが明らかとなっている。また菌体において、2種類のLPSの割合が変わることで細胞表層の疎水性の変化とそれによる基質への付着性が変化することが報告されている。これらのことから、本研究ではMVの菌体付着因子としてLPSに注目し、LPSがMVの菌体への付着に与える影響を調べることを目的とした。A band、B bandの一方、あるいは両方を欠損した緑膿菌株由来のMVを蛍光染色して野生株の菌体液と混合し、洗浄後細胞に残存する蛍光量を付着率として、LPSの有無が付着に与える影響を調べた。その結果、野生株由来のMVと比較してLPS欠損株由来のMVは細胞への付着率が低下した。特にB bandを欠損したMVを用いた場合に顕著に低下した。pH中性環境下でA bandは電氣的に中性であるのに対しB bandは負に帯電していることから、MVと菌体の付着にはLPSの電荷が影響することが示唆された。今後、受容細胞に各種LPSを欠損した菌体を用いて、LPSがMVと菌体の付着に与える影響をより詳細に解析していく予定である。

三輪 恵実¹, 岡根 泉², 石賀 康博², 山岡 裕一²¹株式会社テクノスルガ・ラボ, ²筑波大・生命環境

イネ科植物の共生菌として知られる*Epichloë*属菌（バククキン科）は、無性生活環では宿主に病徴を生じさせることなく種子を通じて垂直伝搬し、有性生活環では葉鞘上に子座を形成し子嚢胞子によって水平伝搬する。これまでに本属菌の子座形成は菌の遺伝子型によって差異のあることが示唆されている一方で、種子感染と遺伝子型との関連性についての報告はない。また、自然環境下での本属菌の伝搬戦略と遺伝子型との関連性や子嚢胞子の感染部位など、その実態については不明な点が多い。そこで本研究では、ヤマカモジグサを宿主とする*E. sylvatica*を対象とし、本菌の遺伝的多型と伝搬様式との関連性を明らかにすることを目的とした。筑波大学川上演習林内に自生するヤマカモジグサ91個体の稈212本から*E. sylvatica*220株を分離した。それらの菌株についてrDNA ITS領域および β -tubulin遺伝子塩基配列を解析した結果、6遺伝子型（遺伝子型I-VI）に類別された。また、各稈の子座形成の有無とそこから分離された菌の遺伝子型に基づき各遺伝子型の子座形成率を算出した結果、遺伝子型I、II、IIIの子座形成率は20.0-77.8%、遺伝子型IV、V、VIは0%と子座形成率は遺伝子型によって顕著に異なることが明らかになった。次に、*Epichloë*属特異的プライマーを用いたDNA検出によって本菌の種子感染を調査した結果、調査した種子615粒中342粒（55.6%）から本菌が検出された。さらに、本菌のDNAが検出された種子180粒を選抜し、感染している菌が子座形成系統（遺伝子型I、II、III）と非形成系統（遺伝子型IV、V、VI）のいずれであるかを調査した。その結果、子座形成系統では子嚢胞子による水平伝搬に加えて、種子を通じた垂直伝搬も機能していることが明らかになった。また、子座形成が3年間認められなかった植物由来の種子に感染している菌は全て非形成系統だったことから、これまで認識されていた子嚢胞子による小花柱頭を通じた種子への感染は、自然環境下ではほぼ生じていないことが示唆された。以上より、*E. sylvatica*には種子を通じた垂直伝搬を主な伝搬手段とする系統と垂直伝搬と水平伝搬の両方の伝搬機構を有する系統が存在し、さらに、これらの伝搬様式の異なる系統は一植物体内にも混在し得ることが明らかになった。

岩崎 還焔, Hafidah Nur Siti, 原 新太郎, 新井 沙和, 菅原 雅之, 南澤 究
東北大・院生命

【背景と目的】Methylobacterium属細菌はモノカーボン化合物資化能を持ち、植物圏では葉面に分布する主要な細菌として知られている。当研究室では、ダイズ莢におけるMethylobacterium属細菌の相対存在比が連作年数増加とともに上昇することを見出しており、これらのダイズ莢内での挙動とともに、その局在性に興味を持たれた。そこで、Methylobacterium属細菌のgusA (beta-glucuronidase遺伝子) 標識株をダイズに接種し、GUS染色法でダイズ莢内での分布を調べた。【実験方法】供試するMethylobacterium 属細菌のgusA標識株は、宮城県鹿島台圃場のダイズ茎から分離されたMethylobacterium sp. AMS5株を元に作成された。無菌条件下で根粒菌を感染させたダイズ(Glycine max cv. Enrei) に以下の2種類の方法でgusA標識株を接種した。すなわち、通常接種では播種後8日目に 1.0×10^9 cell相当の菌体懸濁液を土壌に接種し、注射接種では播種後34日目(R1、開花始)に 2.0×10^7 cell相当の菌体懸濁液を太さ0.5 mmのシリンジ針を用いて茎に注入した。栽培は人工気象器にて明期12時間25°C、暗期12時間25°Cの条件下で行った。一定期間栽培後、莢をGUS染色液で処理し、透明化処理の後顕微鏡で観察した。【結果と考察】GUS染色の結果、いずれの接種方法でもレプ lum や莢壁の維管束部分がgusA標識株の存在を示す青色を呈し、gusA標識Methylobacterium sp. AMS5株はダイズ莢の維管束に沿って分布することが示された。また、種皮も同様に青色を呈したが、その内部の種子には変化が認められなかった。(i) Methylobacterium sp. AMS5株がウレイドおよびその分解物である尿素の資化能を持って、(ii) 維管束および種皮にはウレイドが存在することから、Methylobacterium sp. AMS5株は、ダイズ莢内のウレイドを利用して生存している可能性が示唆された。一般的にMethylobacterium属細菌は植物表面に分布する例が多数報告されているが、維管束や種皮のような植物組織内部で観察されたことは興味深い。

岡田 若子¹, Sakuntala Saijai¹, 安藤 晃規^{1, 2}, 宮本 憲二³, 加藤 康夫⁴, 篠原 信⁵, 小川 順^{1, 2}
¹京大・院農・応用生命, ²京大・生理化学, ³慶大・理工, ⁴富山県立大・工・生工研セ, ⁵農研機構

【背景】我々は、これまでに水系において有機物の効率的なアンモニア化成と硝酸化成を実現する土壌微生物群の集積化に成功し、集積菌群を活用することで、硝化反応が繰り返し可能であること、ならびに、再現性のよい窒素動態が観察できることを明らかにしている。また、硝化反応中の菌叢の推移をDGGE解析にて観察した結果、単純な菌叢に収斂していることを明らかにしている。そこで本研究では、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の標準株、ならびに、任意の従属栄養細菌の3菌種での効率的な硝化を実現する硝化モデル系（アンモニア化成、硝酸化成）の構築を検討したので報告する。【方法・結果】

Nitrosomonas europaea NBRC14298、*Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297、任意の従属栄養細菌を、有機態窒素含有栄養培地を用い好気条件下にて共培養し、三態窒素の推移を指標に、効率的な硝化を実現できる従属栄養細菌のスクリーニングを行った。結果、*Bacillus badius* NBRC 15713と硝化菌群を共培養した際に、効率的な硝化が実現できることを明らかにした。また、3菌系における硝化条件の検討を行ったところ、pH7-10、C/N比10-50、有機物濃度0.2%以下の条件下において、種々の有機態窒素の硝化が可能であることを明らかにした。さらに、ポリペプトンNF（全窒素120 mg、C/N比10）含有培地、28°C、11日間の硝化反応における菌叢推移をRT-PCRにより解析した結果、硝化菌群の動態が亜硝酸イオン、硝酸イオンの推移と高い相関を示すことを見出した。本硝化モデルは、有機物からのアンモニア化成、ならびに、硝酸化成のモデルとして有用である。

後藤 栞¹, 竹下 和貴², 大林 翼³, 曾根 輝雄⁴, 松浦 優², 菊池 義智^{1, 5}¹北大・院農, ²琉球大・熱生研, ³CNRS, ⁴北大・食資源, ⁵産総研・生物プロセス

細菌との内部共生は動植物に普遍的な現象で、共生細菌は宿主の栄養代謝において極めて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。

ダイズの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(盲囊)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の土壌細菌で、ホソヘリカメムシは幼虫期に土壌中からこの細菌を特異的に獲得することが報告されている。この共生細菌は培養および遺伝子組換えが容易であり、また宿主カメムシはRNAiが可能であることから、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系は内部共生現象の遺伝的基盤をひも解くための有用なモデル系だと考えられている。我々はこれまでの研究で、共生細菌はカメムシ腸内で小型化し、一部は球形へと変化することを明らかにしてきた。また、これに伴い細胞表層構造が大きく変化し、界面活性剤など細胞表層へのストレスに高い感受性を示すようになる。そこで本研究では、*Burkholderia* 共生細菌がカメムシ腸内で小型球形になる機構を明らかにするべく研究を行った。

まず栄養素の影響を明らかにするために培地中の炭素源を制限・変更して培養したところ、菌体の小型化は観察されたものの球形化は見られなかった。次に、試験管培養時の共生細菌に抗生物質などのストレスを与えその形態を観察したところ、細胞壁合成阻害剤であるホスホマイシン添加時にのみ球形になることが明らかとなった。このことから、共生細菌のカメムシ腸内における形態変化には、腸内の栄養環境およびストレス因子が重要な働きをしていると考えられる。さらに共生特異的な形態変化に関わる共生細菌側の因子を調査するために、研究室で作成した共生細菌の様々な遺伝子変異株をカメムシに感染させ観察したところ、細胞壁合成に関わるAmiC遺伝子の変異株がカメムシ腸内で劇的に形態変化することが明らかとなった。この株は腸内特異的に膨大化するが、試験管培養時にホスホマイシンを添加することでこの膨大化が再現されることも確認された。

以上の結果より、カメムシ盲囊内には共生細菌の細胞壁合成阻害因子が存在し、この因子により *Burkholderia* 共生細菌が細胞形態を保てなくなった結果、球形になるものと考えられる。

稲垣 辰哉, 松浦 健二
京都大・院農・昆虫生態

様々な分類群の生物において多様な腸内微生物と宿主の関係が知られている。腸内微生物は餌の消化吸収だけでなく宿主の免疫や行動にも影響するなど、その機能は多岐にわたる。その中でもシロアリ、特に下等シロアリと呼ばれるグループの腸内には1~10数種類の原生動物と多種のバクテリアが生息していることが知られている。シロアリは餌である木材の消化のほとんどを腸内微生物に依存しており、両者は絶対共生関係で結ばれている。シロアリの腸内微生物は宿主に多くの影響を与えることが考えられるが、その研究の多くは腸内における木材消化などの機能に限られてきた。本研究において私たちはシロアリの腸内微生物が宿主体外の病原性バクテリアの増殖を抑制していることを明らかにした。シロアリに対して日和見的に感染する細菌であるセラチア(*Serratia* sp.)の増殖したる紙を、ネバダオオシロアリのワーカーに与えた後に新しい紙上で飼育したところ、腸内微生物を薬剤で除去した個体では体外へのセラチアの流出を防ぐことができなかったが腸内微生物を持つ個体ではセラチアの流出が抑制された。腸内の酢酸量を比較したところ、腸内微生物を持つ個体は腸内微生物除去個体より多くの酢酸を持っていた。さらにセラチアを食べさせた個体では酢酸量が増加していた。このことから腸内微生物がセルロースを分解することによって生じる酢酸が、シロアリの炭素源としての機能だけでなく巣内の環境維持にも貢献していることが示唆された。これらの結果からシロアリの腸内微生物の新たな機能が明らかになったといえる。腸内微生物の機能が宿主の体外まで拡張されることで体外の微生物との相互作用が生じ、宿主との共進化にも影響を及ぼすだろう。

大竹 遥, 菅原 雅之, 高橋 智子, 南澤 究
東北大・院生命

【背景と目的】ダイズ根粒菌ゲノムは共生アイランドとコアゲノムから成り、共生アイランド内は変化の速い領域と保守的共生遺伝子領域がモザイク状態に存在することが比較ゲノムから推定されてきた (Kaneko *et al.* 2011)。しかし、実験室でその変化が追跡された事例はない。*Rj2* 遺伝子型を保有するダイズ品種 Hardee はダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 株と共生不和合性を示す (Yang *et al.* 2010)。この共生不和合性は III 型タンパク質分泌系 (T3SS) 構造体 (Tsukui *et al.* 2013) と、一つの T3SS エフェクター (Sugawara *et al.* 未発表) により担われていた。本研究では、本来は共生不和合性根粒菌株を *Rj2* ダイズに接種すると稀に根粒が形成される現象に着目し、根粒菌ゲノムの変化を追跡することを目的とした。

【材料と方法】*Rj2* ダイズ Hardee に共生不和合性を示す根粒菌 *B. diazoefficiens* USDA122 株、*B. japonicum* J5 株等を接種し、低頻度で形成された根粒から根粒菌株を分離した。それらを Hardee に再接種し、通常の根粒形成を行った株を対象として、MiSeq によりドラフトゲノム配列を決定し、親株ゲノムとの比較解析を行った。欠失推定領域については別途サンガー法で塩基配列の確認を行った。【結果と考察】本来 *Rj2* ダイズ Hardee に共生不和合性を示す USDA122 株から Hardee に通常の根粒形成を行う変異株を複数得た。しかし、これらの変異株は窒素固定を行わない変異株 (Fix-) と窒素固定を行う変異株 (Fix+) が混在した。Fix- 変異株は共生アイランド上の T3SS 構造体をコードしている *rhc* 遺伝子群とその近傍の *nif* (窒素固定) 遺伝子群とともに、挿入配列 ISRj1 と ISRj2 を境に欠失していることが示唆された。一方、Fix+ 変異株には上記の原因エフェクター遺伝子への ISRj1 と ISRj2 の挿入が観察された。以上の結果より、Hardee への接種実験の過程で、共生アイランドの大規模欠失、および挿入配列の活性化が生じたと考えられた。また、共生不和合性 *B. japonicum* J5 株の結果についても報告する予定である。

新庄 莉奈¹, Albert Christian S. Suñer^{1, 2}, 上坂 一馬³, 井原 邦夫³, 田中 愛子¹, 近藤 始彦¹

¹名古屋大・院生命農学, ²Philippine Rice Research Institute, ³名古屋大・遺伝子実験施設

植物内生細菌 (エンドファイト) は多様なメカニズムで植物の生育を促進することが知られている。中でも窒素固定能をもつエンドファイトは、植物の生長に必須な窒素を供給しバイオマス増加をもたらす可能性があるためその利用が期待される。窒素固定エンドファイトとの共生はサトウキビ、サツマイモなど高糖性の作物や、コムギやイネなど様々な非マメ科植物で報告されてきた。先に、サツマイモから新規の*Burkholderia vietnamiensis* RS1株を単離し、このRS1株が高酸素条件下で窒素固定能を維持すること、その際に細胞外高分子物質(EPS)の生産をとまなうこと、またイネの生育を促進することを報告した。本研究では、サトウキビおよびイネからさらに窒素固定エンドファイトを単離し、*in vitro*あるいはイネ接種時の窒素固定活性、窒素固定以外の生長促進に関連する可能性のある植物ホルモン生産、EPS生産性に関連するゲノム情報についてRS1株と比較しながら解析を行った。さらにイネ幼苗の生育に対する影響を調査した。単離には、名古屋大学圃場でポット栽培したイネおよびサツマイモ根部を用いた。また、フィリピン・ネグロス島で連作されているサトウキビの茎部、およびサトウキビ茎葉部のバガス (絞りかす) から作られた堆肥からの単離も試みた。イネ根部からは 3.5×10^4 CFU gfw⁻¹の好気性菌が単離され、内3~27%がニトロゲナーゼ還元酵素遺伝子*nifH*を有する窒素固定細菌であることが分かった。これらの菌はすべて*Herbaspirillum*属、*Sphingomonadales*属に分類された。一方サトウキビ茎部・バガス堆肥からも*nifH*遺伝子を有する2種の窒素固定細菌を単離した。またRS1株ゲノムにおいて植物ホルモン生産・分解関連遺伝子を解析したところ、オーキシン生産関連遺伝子およびACCデアミナーゼ遺伝子が確認された。さらにRS1株では*B. cepacia*と相溶性の高いEPS生産関連遺伝子クラスターも確認された。イネ・サトウキビから新規に単離した菌株についてもこれらの形質についてRS1株と比較解析し報告する。

Nusrat Ahsan¹, Tomoki Nishioka¹, Haruhisa Suga², Hiroyuki Koyama¹, Masafumi Shimizu¹

¹岐阜大・応用生物, ²岐阜大・生命セ

It is well known that some rhizobacteria can enhance plant growth and protect host plants from pathogens. Better understanding and engineering such beneficial interactions between plants and beneficial rhizobacteria are necessary for the development of sustainable plant production systems. In this study, we analysed bacterial community of tea rhizosphere using Illumina Miseq sequencing of 16S rRNA gene amplicons. The result obtained showed that *Burkholderia*, *Rhodanobacter*, *Acidocella*, *Bacillus* were dominant genera in tea rhizosphere. Among them, genus *Bacillus* are well known for their anti-pathogenic effects and ability to stimulate plant growth. Therefore, we evaluated plant growth-promoting (PGP) traits and anti-pathogenic activity of *Bacillus* strains obtained from tea rhizosphere. A total of 92 *Bacillus* strains were screened for antagonistic effect against two plant pathogens (*Ralstonia solanacearum* and *Sclerotinia sclerotiorum*) and multiple PGP traits such as phosphate solubilisation, indole acetic acid production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase production and siderophore production. Among the strains tested, 45 strains exhibited antagonistic activity against both pathogens and 90 strains exhibited multiple PGP traits. In planta experiments are now being conducted to determine the potential of these strains for suppressing plant diseases and growth promotion.

井村 友英¹, 高橋 優実¹, 岡田 亮^{1, 2}, 浦山 俊一^{1, 3}, 内田 景子⁴, 植松 清次¹, 福原 敏行¹, 森山 裕充¹
¹農工大院農 細胞分子, ²茨城園研, ³JAMSTEC, ⁴農工大院連農

【目的】エンドルナウイルス（Endornavirus:EV）は「宿主植物体には病徴を示さないプラスミド様2本鎖RNA（dsRNA）」というユニークなウイルスとして提唱された、高分子dsRNAレプリコンである。これまでに、イネ、メロン、ピーマン、アボガド、インゲンマメ、ツルムラサキ、オオムギ、シカクマメ、アマモなどのEVが報告されているが、EVが宿主植物に及ぼす影響については、未解明な点が多い。一方、菌界やクロミスタ界においてはその影響がわかりつつあり、我々の研究グループにおいては、アスバラガス疫病菌にEVが感染することによって、菌糸の生育速度や、複数種の殺菌剤に対する感受性が変化することを提唱してきた。したがって、EVは宿主植物に対しても、その形態や生理現象に何らかの影響を与えていることが予想され、農業等に対する応答や感受性も感染株と非感染株で異なっていることが予想される。本研究では、重要な作物であるイネに潜伏感染する *Oryza sativa endornavirus*（OsEV）が宿主に与える影響について、特に形態や収穫量について調査した。先行研究により、イネの培養細胞や花粉細胞においてOsEVのコピー数が増加することが報告されている。培養細胞を誘導する際、オーキシン様物質の1種であり、除草剤としても用いられる2,4-Dを人工的に与える他、花粉細胞はオーキシン濃度が比較的高いことから、OsEVとオーキシン様物質との関連性が予想される。そこで、宿主の2,4-Dに対する感受性の違いについて調査した。【方法】1. OsEVの感染が宿主の形態に及ぼす影響調査日本晴のOsEV感染株及び非感染株を野外でポット栽培し、発芽率・shoot長・分げつ数・1つの穂あたりの種子数を計測して比較した。2. 2,4-D処理試験日本晴のOsEV感染株及び非感染株を無菌培養し、これに様々な方法で2,4-D処理を行い、2,4-Dに対する耐性の違いを調査した。方法としてはshootへの噴霧処理、培地への添加、発芽前の種子の浸漬処理を用いた。【結果・考察】OsEVの感染が宿主の形態に及ぼす影響調査により、感染株では、非感染株に対する発芽率の低下、shoot長の生長抑制、分げつ数の減少、1つの穂に実る種子数の減少などが起こることが示唆された。また、2,4-Dの噴霧処理試験において、OsEV感染株の2,4-D耐性の向上が示唆された。

衛藤 美咲, 矢原 徹一, 黒岩 亜梨花, 濱村 奈津子
九州大・システム生命科学府

屋久島は世界自然遺産に登録されており、特異な生態系と優れた自然景観を有する。しかし近年では、島内に生息するヤクシカの生息密度の増加による食害が下層植生の深刻な減少を引き起こし、森林生態系への影響が懸念されている。ヤクシカは反芻動物であり、第1胃に生息するルーメンマイクロバイオーム(以降RM)によって植物を分解発酵し、宿主エネルギー源の70%にもなる揮発性脂肪酸を産生している。そのためRMは、反芻動物の代謝を含む生命活動において重要な役割を果たしており、宿主の食餌の変化に応じてその群集構造や多様性が推移することが報告されている。屋久島内でも高密度の地域のヤクシカは、落葉や不嗜好植物の採食を始めるなど食性を柔軟にしており、このようなヤクシカの食餌の変化は、宿主のRMに反映されている可能性がある。そこで本研究では、屋久島の森林生態系の適切な保護の観点から、ヤクシカの食性の柔軟化によるRMへの影響を調べるとともに、未解明な部分の多い野生反芻動物におけるRMの生態を明らかにし、反芻動物の生理に関する理解を向上させることを目的とした。ヤクシカのルーメン細菌群集構造を、16S rRNA遺伝子配列の次世代シーケンシングにより解析した結果、食性の柔軟化により落葉の採食が多く報告されている高密度の地域のヤクシカは、密度の低下がみられる地域の個体と比較して、RMの多様度が有意に高く、両者は群集構造も異なっていた($P<0.05$)。それに加え、同じ河川界に生息していたヤクシカでも年次的に群集構造は推移している傾向があった。また、他の反芻動物との比較を行った結果、ヤクシカのRMでは、*Ruminococcaceae*科や*Prevotellaceae*科などの繊維分解細菌の割合が高かったため、ヤクシカは繊維質の多い食餌から効率よくエネルギーを得ることができると考えられる。さらに、ヤクシカはエゾシカや家畜のニホンジカと比較してRMの多様度が有意に高く($P<0.001$)、RMの多様性は、温暖多雨な屋久島でヤクシカが採餌可能な食餌の種類の豊富さと関連している可能性がある。これらヤクシカRMの特徴は、高密度下でのヤクシカの食餌の柔軟化と栄養状態の維持に大きく貢献していると考えられ、ヤクシカの食性変化や個体数変動を理解する上での基盤的情報となることが期待できる。

三澤 碩希¹, 堀米 由夏¹, 古川 仁², 山下 昌三³, 山田 明義¹¹信大院・農, ²長野県林技セ, ³KOA(株)

野外におけるマツタケのシロは、しばしば遺伝的に異なる複数の個体から構成されている。この現象を実験室内で再現するため、菌根合成によって作成したアカマツを宿主とするマツタケ菌根苗に対してマツタケの胞子を二次的に接種する操作が行われている。この胞子接種により、アカマツの根系には元の接種菌株（培養株）と胞子由来のマツタケ個体が共存しうることが、rDNA IGS1領域の解析により示された。しかし、IGS1領域の個体識別感度は必ずしも高くないため、胞子由来の個体の多様性は不明であった。マツタケの培養株や個体を識別するDNAマーカーとして、IGS1、SNP、SSR、レトロトランスポゾンのLTRなどが知られているが、マーカー間の識別感度比較は十分には行われていない。本研究では、これまでマツタケでは報告例のないrDNA IGS2領域のマーカーとしての利用可能性を検討するとともに、既知マーカーの識別感度を比較し、マツタケのシロの遺伝的構成をより詳細に解析することを目的とした。既知マーカーの比較にあたり、マツタケ単一子実体から多胞子分離により得られた姉妹株のうち3菌株（#52, #84, #99）を用いた。IGS2についての検討では、#52, #84を用い、クローニングによる全長決定と配列比較から個体識別に利用可能な変異箇所を特定し、PCR-RFLP分析を行った。SNP分析では、地理的に離れた個体の識別が可能な既報の5SNPについて、3菌株間で比較した。SSRマーカーとLTRでは、それぞれ3菌株間でPCR産物の電気泳動パターンを比較した。さらにLTRでは、3菌株を含む姉妹株9菌株と別の子実体由来の2菌株の計11菌株で比較解析した。以上の結果、LTRマーカーが最も高い識別感度を示し、11菌株の識別が可能であった。マツタケ菌根苗（菌根合成+胞子接種）の解析には、LTRマーカーを用いた。根系より採取した菌根チップについてpS1プライマー、pS48/pL281プライマーペアでそれぞれPCR増幅を行い、電気泳動によりバンドパターンを比較した。胞子非接種区では、接種した培養株と同一のバンドパターンが示され、菌根1チップでも十分解析可能だった。胞子接種区では、接種培養株のバンドパターンとともに、新たなバンドパターンが複数出現し、胞子由来の複数の個体による菌根形成が確認された。

小川 なつみ¹, 石毛 太郎², 加藤 広海¹, 大坪 嘉行¹, 永田 裕二¹, 吉川 博文², 津田 雅孝¹
¹東北大・院生命, ²東京農業大・生物資源ゲノム解析センター

これまでに、様々な汚染物質分解細菌株が単離され、分解機構が解明されてきたが、自然環境では、共存する異種細菌間との協調的な物質代謝が予想されるため、細菌集団としての汚染物質分解を理解する必要がある。実際、分解細菌株は、単離過程で、非分解細菌を含めた異種細菌と複合微生物系（コンソーシアム）を形成しているが、その共存機構の解明例は限られている。本機構を解明するため、我々はフェナントレン（Phn）を含む芳香族化合物汚染土壌から取得したPhn分解コンソーシアム

（MixEPa4）の解析を行ってきた。MixEPa4では、分解細菌*Mycobacterium* sp. EPa45株のPhnによる生育阻害が、非分解細菌*Burkholderia* sp. Bcrs1W株との混合培養により緩和される効果（SGI効果: Suppression of Growth Inhibition）を見出した。さらに、*B. multivorans* ATCC 17616株を含む多様なPhn非分解細菌株もSGI効果を示す一般性と、増殖能を示す非分解細菌とEPa45株の直接的な接触が本効果に必要であるという知見を得ている。EPa45株のPhnによる生育阻害、並びに非分解細菌株のEPa45株に対するSGI効果の分子機構を解明するため、本研究ではRNA-seq解析で、EPa45株単独培養時およびATCC 17616株との混合培養時に、Phn添加で転写量が変動する遺伝子群を同定することを目的とした。単独培養では、EPa45株の160遺伝子の転写量が増加（対照区と比較して5倍以上）した。その中には、推定Phn代謝遺伝子群のみならず、鉄の取り込みに関わる遺伝子群等が含まれており、細胞内の鉄の不足が生育阻害の原因である可能性が示唆された。またATCC 17616株との混合培養によって、EPa45株の8遺伝子の転写量が増加した。最も転写量が増加した遺伝子のコードするRhodaneseは酸化ストレス耐性に重要であると他属細菌で知られているため、ATCC 17616株共存下でEPa45株の酸化ストレス耐性が誘導される可能性が示唆された。一方混合したATCC 17616株では、Phn分解中間体であるフタル酸の推定分解遺伝子群を含む200程度の遺伝子の転写量が増加し、両株は混合培養時にフタル酸を介してPhnを協調的に代謝すると示唆された。

石井 悠¹, 鎌田 このみ², 高橋 俊一², 皆川 純², 丸山 真一朗¹, 河田 雅圭¹¹東北大・院生命, ²基生研・環境光生物

単細胞藻類の中には海産無脊椎動物と共生関係にある種が多く存在する。中でも刺胞動物（クラゲ・サンゴ・イソギンチャクなど）に細胞内共生する渦鞭毛藻類（*Symbiodinium* spp.）は褐虫藻と呼ばれ、貧栄養の熱帯・亜熱帯海域の生態系を支える一次生産者としての大きな役割を担っている。近年褐虫藻2種のゲノムが解読された(Lin et al. 2015, Shoguchi et al. 2013)ことから、共生に関わる遺伝子発現の解析、さらには遺伝子の機能に関する研究が進展することが期待される。そのため、遺伝子導入・組換えなど、褐虫藻に特化した遺伝子やゲノムの機能解析ツールの開発を行うことが急務となっているが、未だ不十分であると言わざるを得ない。本研究では、遺伝子導入法を開発する上で有用な褐虫藻の栄養要求性株の樹立に成功したことを報告する。ウラシルの合成に必須なOrotidine-5'-P Decarboxylase (OMPase) に変異を持つ細胞をスクリーニングするため、OMPase活性を持つ細胞には致死的效果を持つ5-フルオロオロチン酸（FOA）とウラシルを含む培地で細胞を培養し、自然発生的な突然変異によりFOA耐性かつウラシル要求株を示すようになった変異株を樹立した。ウラシル要求性株のゲノムにおける変異箇所の特定を行ったところ、OMPase配列中に一塩基置換が確認され、その置換により転写産物レベルでは3残基のアミノ酸欠損を引き起こすスプライシングエラーが起こっていることを明らかにした。さらに、酵母をもちいてOMPase酵素活性の相補性検定を行ったところ、ウラシル要求性株では酵素活性が検出されないことが示され、OMPaseがFOA耐性かつウラシル要求性という表現型を示す原因遺伝子であることを確認した。今回得られたFOA耐性ウラシル要求株は褐虫藻の遺伝子導入系の開発に大きな役割を担うと期待される。

橋本 暁¹, 吉川 禄助², 中川 草³, 岡本 宗裕⁴, 宮沢 孝幸¹¹京都大学 ウイルス・再生医科学研究所, ²長崎大学 熱帯医学研究所, ³東海大学 医学部, ⁴京都大学 霊長類研究所

サルフォーミーウイルス（simian foamy virus : SFV）はあらゆる霊長類に存在する非病原性のレトロウイルスである。他のレトロウイルスと比べ、SFVは非常に安定したウイルスゲノムを保持している。そのため、ヒトを除くすべての霊長類では固有のSFVが認められ、宿主との共種分化を示すことが報告されている。我々が以前報告したニホンザル由来のSFVも例外では無く、タイワンザルやアカゲザルといった遺伝的に近縁なサル由来のSFVと高い相同性をもつことが示された。日本列島には多くのニホンザルのコロニーが存在するが、屋久島に棲息するヤクシマザルと、それ以外に棲息するニホンザルに大きく分けられることが知られている。ニホンザルは約4, 50万年前から数万年前にいくつか朝鮮半島を経由して日本列島に移動してきたアカゲザルの子孫である。ヤクシマザルもその中に含まれるが、ヤクシマザルは約17万年前に屋久島に移動してきたニホンザルの子孫であることが、ミトコンドリアDNAを使った解析でわかっている。今回、我々はヤクシマザル由来のSFV及びタイワンザル由来のSFVを新たに分離し、系統樹解析を行った。驚いたことに、ヤクシマザルのSFVは他のアジア圏に棲息するサルとは別のクレードを形成し、ミトコンドリアDNAを使った解析とは違う結果を示した。これらの事から、ヤクシマザルはニホンザルと異なる種分化経路をへている可能性が示唆された。

板倉 学¹, 三屋 公佑², 金原 一真², 原 新太郎², 渡辺 剛², 菅原 雅之², 金子 貴一¹, 南澤 究²¹京産大・生体進化発生セ, ²東北大・院・生命

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110は栽培ダイズに対する窒素固定効率が高いだけでなく、N₂O還元酵素によりダイズ根圏から発生するN₂Oを削減できることが報告されており、有用根粒菌株として注目されている。これまでに日本各地の圃場から多くのUSDA110系統の土着菌（110系統）が分離されてきており、本研究ではこれら110系統におけるゲノム構造の多様性を解明することを目的とした。日本各地の圃場より分離された110系統11株のドラフトゲノム配列とUSDA110の全ゲノム配列を用いて、GGDCによりゲノム距離を算出しクラスター解析を行った結果、110系統は3つのクラスターに分かれた。これらの株において共生窒素固定、3型分泌装置、脱窒に関連する遺伝子は全ての株で保存されていたが、水素取り込みに関わる吸収型ヒドロゲナーゼ遺伝子（*hupSL1*）はクラスター2の全て及びクラスター3の一部の株では保存されていなかった。さらに110系統63株の*hupSL1*遺伝子をPCRで調査した結果、九州、関東地方では*hupSL1*+株、北海道、東方地方では*hupSL1*-株が多く分離される傾向が観察された。USDA110において*hupSL1*はゲノミックアイランド（GI）であるtrnM1 element上に存在しているため、このGI領域の構造比較を行った。その結果、*hupSL1*+株ではGI全体がほぼ完全に保存されていた。一方、*hupSL1*-株ではGIの大部分は保存されていたが、*hupSL1*を含む26 kbの領域が共通して欠失しており、GIを獲得した後に欠失が起こったことが示唆された。さらに、*hupSL1*+株と*hupSL1*-株のGIは共通の祖先型GIからそれぞれ派生したことが示唆された。USDA110のtrnM1 element以外のGIsについても構造比較を行った結果、クラスター1の株ではUSDA110の保有するGIsのほとんどが保存されていたが、クラスター2、3の株ではほとんどのGIsが存在しないかあるいは部分的な欠失が生じていた。以上の結果より、土着110系統のGIs構造には多様性があり、*hup*遺伝子群の有無を含むGIs構造変化が環境適応に影響している可能性が考えられる。

三石 美幸¹, 高階 史章², 保田 謙太郎², 金田 吉弘², 佐藤 孝²¹秋田県立大・院生物資源, ²秋田県立大・生物資源

【目的】ダイズ根粒菌は多様な特徴を持つことが知られており、ダイズの生育向上のためには窒素固定活性や増殖能力の優れた根粒菌の感染が必要となる。これまで、秋田県立大学附属フィールド教育研究センター内で栽培体系の異なる3圃場からダイズ根粒菌を分離し、それらの遺伝子保有と増殖特性について解析した。田畑輪換圃場(水田、畑)では輪作畑と比較して、嫌気増殖株と亜酸化窒素還元酵素遺伝子(*nosZ*)の保有株割合が多かったことから、水田と畑を繰り返す田畑輪換体系では、酸素濃度や水分などの環境変化に適応した根粒菌が生存していると考えられた。そこで本試験では、田畑輪換圃場から分離された嫌気増殖能を有するダイズ根粒菌の特徴を調べた。【方法】試験①USDA110を対照として田畑輪換圃場から分離した株の嫌気増殖機構を調べた。YM液体培地をバイアル瓶に分注し、無処理培地(微好気条件)とアルゴンガス(Ar)でパブリックしたAr処理培地(嫌気条件)を作製した。オートクレーブ滅菌後、根粒菌培養液を菌濃度が 1×10^2 cells/mLとなるように接種し、35°C 暗所で2週間静置培養した。培養後、バイアル瓶の気相中の N_2O を定量した。試験②共生窒素固定活性を調べるために、1/10000aポットに滅菌パーミキュライトを充填し、殺菌したダイズ種子(リュウホウ)を播種した。覆土した上部から菌濃度 1×10^8 cells/mLの根粒菌培養液を添加し、人工気象器内(昼25°C-16h/夜20°C-8h)で30日間栽培後、アセチレン還元活性を測定した。【結果と考察】Ar処理・無処理培地ともに、一部の分離株は増殖したが、USDA110は増殖しなかった。また、一部の分離株では無処理培地で N_2O が確認され、Ar処理培地では確認されなかった。一方、USDA110ではAr処理に関わらず、 N_2O 発生が見られなかった。硝酸態窒素は酵素遺伝子*napA*, *nirK*, *norC*, *nosZ*の働きにより、 $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ と還元される。分離株のAr処理培地で N_2O が発生しなかったことから、微好気条件では N_2O まで還元され、嫌気条件では $nosZ$ により N_2O が N_2 に還元される可能性が示唆された。植物体あたりの共生窒素固定活性はUSDA110と同等な株が得られたが、根粒数はUSDA110の方が多かった。根粒1個あたりの共生窒素固定活性を算出したところ、USDA110よりも高い菌株も見られた。田畑輪換圃場から、嫌気増殖能と高窒素固定活性を持つ株が得られたことから、両者の関係性が示唆された。

渡辺 剛¹, 原 新太郎¹, 新井 沙和¹, 高橋 智子¹, 三屋 公佑¹, 菅原 雅之¹, 板倉 学², 金子 貴一², 南澤 究¹
¹東北大・院・生命, ²京産大・生態進化発生研究セ

[背景と目的] 根粒菌はマメ科植物に共生し大気中のN₂ガスを固定する。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 110系統は、一般に吸収型ヒドロゲナーゼ(Hup) をコードする *hupSL1* 遺伝子を有する。Hup系は窒素固定酵素ニトロゲナーゼが生成するH₂を再酸化することにより、エネルギー面で窒素固定効率を上昇させる有利な形質と考えられてきた。しかし、演者らは、*B. diazoefficiens* USDA110に属する土着菌のゲノム比較から、*hup*遺伝子群欠損株が北海道、東北地方に優占していることを発見した。本研究では、根粒からH₂が放出される110系統 *hup*-株が *hup*+株より低温条件で有利であるか検討した。[方法] GFP蛍光標識した *B. diazoefficiens* USDA110を親株として *hupSL1* 遺伝子の人工欠失変異株(Δ hup)を作製した。北海道の気象データから、栽培温度を19°Cと15°Cに設定した。無菌レオナルドジャーにダイズ品種エンレイを播種し、親株または Δ hup株を接種した。ダイズ生育に応じて19°Cは播種後28日、15°Cは播種後43日に十勝土壌20 gを懸濁した水耕液200 mLの上清液を添加した。播種後49-52日(19°C)、播種後97-100日(15°C)に根圏土壌とバルク土壌の水素吸収活性(初期濃度200 ppm H₂)と植物体・根粒の重量等を測定した。[結果と考察] 作製した *hupSL1* 遺伝子を欠失した Δ hup株は、根粒H₂吸収(Hup)活性を示さず、ニトロゲナーゼ由来の活発なH₂発生が観察された。15°C栽培では Δ hup接種ダイズの根粒数が親株接種より有意に増加し、19°C栽培ではそのような相違は観察されなかった。これは、15°Cの低温条件では根粒着生が低下するが、*hup*-株接種によりその負の効果が回避されることを示唆している。 Δ hup接種ダイズの根圏土壌とバルク土壌のH₂吸収活性は親株接種より明らかに上昇した(19°C・15°C栽培)。したがって、根粒から放出されたH₂により根周辺の水素酸化細菌が増殖し、それらが15°Cの低温条件で根粒数増加を誘導したと推定された。根圏土壌およびバルク土壌の細菌群集構造解析の結果も報告する予定である。

鯨島 玲子¹, 山田 祐大², 篠原 一輝³, 城 惣吉⁴, 佐伯 雄一⁵¹ 静岡大学大学院農学領域, ² 静岡大学農学部, ³ 静岡大学総合科学技術研究科農学専攻, ⁴ 島根大学生物資源科学部, ⁵ 宮崎大学農学部

Bradyrhizobium diazoefficiens および *B. japonicum* のダイズ根粒菌には、“HRS株（Highly reiterated sequence-possessing strain）”と呼ばれる多様な挿入配列を多数保有する株の存在が知られている。HRS株は同系統の通常の菌株と異なる特徴を持ち、増殖が遅く、系統と脱窒能が一致しない。また、通常株とは異なりプラスミドを保有することが知られている。HRS株のゲノムは比較的安定と考えられているが、その発生メカニズムは不明である。また田畑輪換圃場やアルカリ土壌などで出現頻度が高く、ストレス環境への適応に関連する可能性もある。静岡のダイズ根粒菌の多様性を調査する過程で、藤枝フィールドの田畑輪換圃場から *B. diazoefficiens* の脱窒能欠損株が15株単離された。このうち、HRS株の特徴である増殖速度の低下は5株のみでみられ、正常な増殖を示すものが多かった。そこで、増殖が正常な脱窒能欠損株はHRS株へと移行する途中であり、HRS株の発生メカニズムに関する知見が得られるかもしれないと考えた。そこで、脱窒能欠損株15株と通常株2株について脱窒型、脱窒遺伝子保有状況、増殖速度を調査し、(A)脱窒、増殖ともに正常な通常株、(B)増殖速度と脱窒遺伝子の保有状況は正常だが脱窒能を欠損している中間型株、(C)すべての脱窒遺伝子を欠損し、増殖速度が不安定な増殖不安定株 (D) 脱窒遺伝子のうち *nos* 遺伝子を欠失し増殖の遅いHRS-like株の4タイプに分類した。現在、その代表株についてMiseqによるドラフトゲノム解析、電気泳動によるプラスミド保持の確認を行っている。

星野 (高田) 裕子¹, 秋山 博子¹, 中島 泰弘^{1, 2}, 山本 昭範³¹農研機構 農業環境変動研究センター, ²農研機構 高度解析センター, ³学芸大

【背景・目的】亜酸化窒素（N₂O）は強力な温室効果ガスかつオゾン層破壊物質である。N₂Oの人為的発生源のうち最大のものは農業で、農耕地において、肥料の施用に加え、作物残渣はN₂Oの重要な発生源である。筆者らが、作物残渣からのN₂O発生メカニズムの解析を進める中で、発生N₂Oの安定同位体比解析及び、分離した糸状菌の解析により、N₂O発生に脱窒糸状菌の寄与が示唆された。そこで、本研究では、作物残渣における脱窒活性が高い糸状菌の菌密度とN₂O発生量の関連を解析するとともに、抗菌剤処理でこれらの菌を阻害することで、N₂O発生量が変化するかどうかを検討した。【方法】茨城県つくば市の農業環境技術研究所ライシメーター圃場において、2013年春と秋の二作ジャガイモを栽培した。慣行に従い、収穫前に地上部を切除し、2週間程度放置した。その後、ジャガイモを収穫し、地上部を漉き込んだ。栽培期間中、地上部切除前と切除1週間後に、土壌および地上部残渣を採取した。各圃場サンプルのN₂O発生ポテンシャルを測定した。一方、圃場から分離した脱窒糸状菌の内、特に活性の高い3種*Fusarium* sp., *Plectosphaerella* sp., *Penicillium* sp.について、サンプルから抽出したDNAを用い定量PCRでサンプル上の菌密度を測定した。また、圃場から採取したジャガイモの葉に抗菌剤を処理し、土壌コア上でインキュベーションした。7日後のサンプルについて、N₂O発生量と残渣上の菌密度を同様に測定した。【結果・考察】3つの菌の密度は土壌においては採取時期によって大きく変化しなかったが、前者2菌種の植物体における密度は採取時期によって劇的に変化した。*Fusarium* sp.は、特に春作の地上部切除1週間後に多く、*Plectosphaerella* sp.は、春作と秋作の地上部切除1週間後に多かった。一方、*Penicillium* sp.は、残渣でも大きな変動はなかった。圃場サンプルのN₂O発生ポテンシャルと、各菌量の相関を見ると、前2菌種の密度が有意な正の相関を示した。抗菌剤処理により、7日後の前2菌株の菌数は大幅に低下し、またN₂O発生量も半分程度に低下した。作物残渣からのN₂O発生に、これらの糸状菌が関与していることが示唆された。

東 佑一¹, 辻野 修平¹, 清水 遼¹, 金田 悠太郎², 藤原 健智¹¹静岡大院・総合科学, ²静岡大・理

硝化は、アンモニアを亜硝酸や硝酸へ異化的に変換する微生物作用であり、窒素サイクルにおける必須の生物学的過程である。様々な従属栄養性細菌が、ピルビン酸オキシムを中間代謝産物とする、独立栄養性の硝化菌とは異なる反応経路によって硝化を行うことが報告されている。Onoら（1999）は、この反応において中心的な役割を果たすピルビン酸オキシム酸素添加酵素（pyruvic oxime dioxygenase ; POD）を、土壌性の従属栄養性硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* から精製した。この酵素は二価鉄を活性中心とする金属酵素であり、酸素を用いてピルビン酸オキシムを分解し亜硝酸を生成する反応を触媒する。さらにPODが、亜鉛酵素として知られるクラスIIアルドラーゼの相同タンパク質であり、亜鉛のかわりに鉄と結合することでオキシゲナーゼとして機能することがTsujiノら（2017）によって示されている。相同性検索の結果、プロテオバクテリア門（ α , β , γ , δ 綱）、放線菌等のアクチノバクテリア門、および子囊菌門に属する *Fusarium oxysporum* 等の菌類に、PODと推定されるタンパク質をコードする遺伝子が見いだされた。土壌環境における優占種の一つである放線菌がPOD遺伝子を持つことは示唆的であり、抗生物質などの生理活性物質の産生以外に、土壌環境における窒素サイクルへの寄与という点でも放線菌が重要な役割を演じている可能性がある。また子囊菌 *F. oxysporum* は微好気条件の下で脱窒を行うことが知られているが、同時に硝化を行うことによって、効率的に土壌から窒素を除去しているかもしれない。今回我々は、*Achromobacter xylosoxidans*（ β -プロテオバクテリア、*A. faecalis* PODとの配列相同性：84%）、*Oligella ureolytica*（ β 、82%）、*Bradyrhizobium* sp. WSM3983（ α 、相同性78%）、*F. oxysporum*（子囊菌、63%）、*Streptomyces tsukubaensis*（放線菌、53%）、*Pseudomonas aeruginosa*（ γ 、47%）等のPODの組み換え体を作成し、その活性と分子的性質を比較分析したので報告する。

二宮 拓也¹, 黒岩 恵¹, 石川 裕士¹, 堺 奎介¹, 櫛田 晃輔¹, 磯部 一夫², 諏訪 裕一¹
¹中央大学院・理工, ²東大院農

[背景・目的] 土壌や海洋等の実環境に存在するアンモニアの濃度は非常に低く、それ故に低栄養性のアンモニア酸化微生物(AOM)が優占していると推察されている。また、環境中にはアンモニアの他に尿素も存在し、ウレアーゼを持つAOMはこれを基質として利用できる。しかしながら、今日までにMPN計数や純粋分離に尿素が用いられた例はほとんどない。本研究では、尿素を基質として低栄養性のAOMを純粋分離することを目的とした。[方法] Suwa *et al.*(1994)のC基礎培地に尿素をアンモニア換算で1.5, 15, 750 mMになるように添加し、それぞれをUU, UL, UH培地とした。これを用いて千葉県鴨川市の森林土壌中のAOMをMPN計数した。さらに、MPNで亜硝酸あるいは硝酸の生成が認められた培養について、アンモニア換算で1.5 mMの尿素を基質に含む培地で5度の植え継ぎを行った後、この集積培養液を鋳型としてアンモニア酸化細菌(AOB)の*amoA* geneをターゲットとしたPCRを行った。PCR産物のクローニング後、32クローンの塩基配列解析を行い、*amoA* geneの塩基配列に基づく系統解析を行った。[結果] MPN計数値はUH培地に比べ、UL培地で8.9倍、UU培地で7.3倍となった。解読した*amoA* gene配列の全てが単一のOTUに集約され、集積培養内には *Nitrosospira*属のcluster 0に類別されるAOBが優占することが示された。これは、*Nitrosospira* sp. Nsp12と最も近縁で、98%の相同性であった。ところで、当研究室ではこれまでに、本研究と同一の採取地から得た森林土壌を接種源として、1.5 mMのNH₄⁺を含む培地を用いたAOMの純粋分離を複数回試みてきた。その結果、2つの純粋分離株、更に3つのAOBの集積培養を獲得したが、これら分離株と集積培養内の優占AOBはすべてcluster 3に類別された。すなわち、本研究で新たに低濃度の尿素を基質とした培地を用いたことで、初めて異なるclusterのAOBが集積培養された。このことから、培地成分を変更する事が新規なAOBを分離する上で有効な手段である可能性が示された。現在、集積培養内のAOBの純粋分離を目指し、純化を進めており、分離完了後はより詳細な系統解析、及び生理学試験を実施する予定である。

橋川 峻二¹, 川内 智裕², 池永 誠³, 境 雅夫³¹鹿児島大学院農, ²鹿児島大学院連合農, ³鹿児島大学学術研究院

【背景・目的】 食糧生産に必要な窒素肥料の多くを、現在は化学窒素肥料に依存している。化学窒素肥料は、大量の化石燃料を消費して製造され、作物による利用効率の低さから土壌に残存した窒素による地下水の硝酸汚染や大気へのN₂O放出による環境問題を引き起こしている。そこで、生物的窒素固定による作物への窒素供給を増大するための研究が推進されている。我々は、これまで植物遺体セルロースから必要な炭素源・エネルギー源を得て窒素固定を行う細菌集団（10数種の細菌で構成）を刈草試料から集積培養により獲得し、その構成細菌種の解析などを進め、未利用植物バイオマスを利用した効率的な窒素肥料生産の研究を行っている。本研究では、このような植物遺体セルロースを利用して窒素固定を行う細菌集団は、①広く分布して存在するのか、②その構成細菌種は共通しているのか、③窒素固定活性・セルロース分解活性に違いはあるのか、について調査した。【方法】 植物遺体を含む様々な試料（刈草、草地土壌、林地土壌）から複数の試料を採取し、セルロースのみを炭素源とする無窒素液体培地に接種して集積培養を行った。セルロース分解と窒素固定が認められた培養について同培地に継代して集積を進めた。得られた集積培養から直接DNAを抽出し16S rRNA遺伝子を対象としたDGGE解析および次世代シーケンスによる細菌群集構造解析を行った。さらに、各集積培養のセルロース分解活性および窒素固定活性を測定して比較した。【結果・考察】 供試した全試料からセルロース分解活性・窒素固定活性を示す集積培養が得られた。DGGE解析の結果、集積された細菌集団はいずれの試料も10～20種の複数の細菌種で構成され、継代した試料間において一定した構成が維持された。次世代シーケンスによる解析の結果、構成細菌種のうち、多くの試料において*Clostridium*属、*Azospirillum*属、*Pseudomonas*属、*Pseudoxanthomonas*属、*Azospira*属、*Azoarcus*属が共通して存在していた。さらに、活性と構成細菌種との関連性を調査した結果、高いセルロース分解活性を示す集積培養間では*Clostridium*属の種類と存在比に共通性が認められ、セルロース分解への関与が示唆された。

森川 峻志¹, 原 新太郎¹, 笠原 康裕², 小柴 太一³, 山崎 清志⁴, 藤原 徹⁴, 徳永 毅³, 南澤 究¹

¹東北大・院生命, ²北大・低温研, ³株式会社アースノート, ⁴東大・院農学生命

【背景と目的】：窒素肥料製造には多量の化石燃料が必要であり、環境負荷や食糧生産持続性が懸念されている。肥料使用削減のために、植物の共生微生物による窒素固定の研究が必要である。イネ科植物体の窒素固定を担っている微生物は主に培養分離により研究され、培養に依存しない原因窒素固定細菌の同定は、サトウキビやイネなどで数例報告されているのみである。本研究では、圃場で栽培したバイオマス生産能の高いソルガムにおいて窒素固定を検出し、それを担っている原因微生物の特定を目的とした。

【方法と材料】：アセチレン還元法(ARA)および¹⁵N₂トレーサー法により窒素固定活性が認められた2系統のソルガム根を材料として、当該植物組織内外に生息している細菌群集のDNAを調製し、Metagenome解析を行った。古細菌・ラン藻・細菌の *nif* データベースを問合せ配列としてMetagenomeデータから相同性90%以上の配列をin house BLASTで抽出し、ヒットした *nifHDK* (*anf/vanHDK*を含む)塩基配列を個別にBLAST検索し、吟味した。また、同じDNAを用いて、16S rRNA(V4領域)のアンプリコン解析を行った。

【結果と考察】：ARAと¹⁵N₂法により定植後約100日目ソルガム根で窒素固定が活発に行われていたことが明らかになった。本ソルガム根に共生する細菌のMetagenome解析を行った結果、*Bradyrhizobium*属細菌（クサネム根粒菌*B. oligotrophicum* S58/*Bradyrhizobium* sp. ORS278や*nod*遺伝子のない*Bradyrhizobium* sp. S23321）の*nifHDK*遺伝子の配列が一貫して検出された（検出*nifH*遺伝子の平均81.8%、検出*nifD*遺伝子の平均82.1%、検出*nifK*遺伝子の平均73.2%）。さらに、アンプリコン解析により、*Bradyrhizobium*属細菌OTUの相対存在比は2.3~3.5%であった。これらの結果より、ソルガム根において*Bradyrhizobium*属細菌が窒素固定を行っている可能性が示唆された。また、Metaproteome解析についても報告する予定である。

本間 大智¹, 齋藤 明広²¹ 静岡工大・院理工, ² 静岡工大・理工

【目的】キチンは、アミノ糖である*N*-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc）を単量体とする多糖で、農業分野での更なる有効活用が期待されている。褐色森林土の畑土壌に対して5%のキチンを添加して培養すると、添加キチンの減少に伴ってアンモニア態窒素（以下、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）量が増加した（井浪ら, 2015）。このとき、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量の増加は、キチン分解量から算出される $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量よりも早い段階に起こっていた。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量増加に伴って土壌中の*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（キチン分解酵素の一種、以下、GlcNAcase）活性が増加した。これらの結果から、土壌に添加したキチンによって生産誘導されたGlcNAcaseが、もともと土壌に存在する窒素含有有機物（地力窒素）に作用してGlcNAcを遊離した可能性が考えられた。本研究は、GlcNAcaseの地力窒素の無機化への関与を土壌へのGlcNAcase添加によって示すことを目的としている。放線菌の推定GlcNAcaseを遺伝子組換え技術によって生産・精製し、酵素学的な特徴を解析した。また土壌への添加実験を試みた。【方法・結果・考察】土壌中の主要なキチン分解細菌であるストレプトミセス属放線菌のモデルである*Streptomyces coelicolor* A3(2)のゲノムの塩基配列情報をもとに、2つの推定分泌型GlcNAcase遺伝子 (*sco6300*, *sco2786*) を大腸菌で発現しそのタンパク質を精製した。精製したタンパク質について、合成基質 [4-メチルウンベリフェロン (4MU) および*p*-ニトロフェノール (pNP) の誘導体] を用いて、至適pHと基質特異性を調べた。SCO6300は300mL培養液から2.9mgの精製タンパク質が得られ、pH5が至適であった。*p*NP- β -GlcNAcと4MU- β -GlcNAcは加水分解したが、*p*NP- α -GlcNAcと4MU- β -GalNAcは分解しなかったことから、*N*-アセチル- β -グルコサミニダーゼであることがわかった。また4MU-(GlcNAc)₂と4MU-(GlcNAc)₃に対しても酵素活性を示すことから、キチンオリゴ糖からGlcNAcを遊離する活性も持つことが示唆された。SCO2786は1.2L培養液から19.9 μ gの精製タンパク質が得られ、至適pHは5であった。4MU- β -GlcNAcと4MU- β -GalNAcは加水分解するが、4MU-(GlcNAc)₂と4MU-(GlcNAc)₃に対しては活性を示さなかったため、*N*-アセチル- β -ヘキソサミニダーゼと結論した。これらの基質特異性が異なる2つの精製酵素の基質となる物質が腐植物質中に存在するのを調べている。【引用】井浪ら(2015) 日本土壌肥料学会京都大会講演要旨集

岩崎 由夏里¹, 齋藤 明広²¹ 静岡工大・院理工, ² 静岡工大・理工

【目的】キチンは *N*-アセチルグルコサミン(以下、GlcNAc)を単量体とするアミノ多糖である。キチンはキチン分解菌が生産する分泌型のキチン分解酵素によって加水分解される。環境中で生成するキチン分解物は、キチン分解菌だけでなく、キチンは分解できないがキチン分解物を資化できる微生物によっても利用されることが想像される。キチンと類似の構造を持つセルロースでは、セルロース分解菌と非分解菌共存下で、非分解菌が分解産物を消費することでセルロース分解が促進される¹⁾。本研究は、キチン添加畑土壌のキチン分解過程におけるキチン分解菌と非キチン分解菌の挙動と相互作用の解明を目的としている。

【方法・結果・考察】キチン添加土壌でのキチン含率とキチナーゼ活性の変化²⁾から、キチン添加5日後ではキチン分解菌が多く、45日後の土壌ではキチン分解菌が減り、キチン分解産物を資化する非キチン分解菌が増えると考え、YG培地を用いてそれぞれ72株ずつ微生物を分離した。キチン分解菌の割合はキチン添加5日後で72%、45日後で37%であった。キチン分解菌、非キチン分解菌のいずれもキチン分解物であるGlcNAcかその二糖を必ず資化した。キチン分解細菌と非キチン分解細菌をコロイド状キチン最小寒天培地で交差培養したところ、キチン分解細菌による非キチン分解細菌の生育促進やキチン分解活性発現が観察されたほか、2つの細菌株の交差部分でのキチン溶解斑の増大が認められた。これらのうち、キチン添加5日後の土壌から分離されたキチン分解細菌 *Streptomyces* sp. 5-44株と単独培養で非キチン分解細菌と判定された *Lysobacter* sp. 5-21a株の同一寒天培地上での共培養において、5-44株による5-21a株の生育促進とキチン分解活性発現、及び交差部分での溶解斑の増大の全てが観察された。5-44株による5-21a株への効果が両者のコロニー間の距離が近いほど高かったことから、5-21a株の生育促進とキチン分解活性発現は、5-44株の分泌物によるものと考えている。今後これらのキチン分解細菌と非キチン分解細菌の相互作用の仕組みを分子レベルで明らかにしていく。【引用文献】1) 春田伸ら (2006). 環境バイオテクノロジー学会誌5: 91-95. 2) 井浪ら (2015) 日本土壌肥料学会講演要旨集, 15:32.

一守 佳奈子¹, 立石 貴浩², 前田 武己², 颯田 尚哉²¹岩手大学大学院総合科学研究科, ²岩手大学農学部

黒ボク土は、リンを吸着・固定する特徴を持っており、リンの施肥管理が行われていない草地や森林などの黒ボク土では、可給態リン含有量が非常に少ない。しかし、このような黒ボク土でも一部の草本植物は生育している。これら植物は黒ボク土中の何らかのリン画分を利用しているものと思われ、この画分は、有機態リンや微生物バイオマスリンである可能性が考えられた。このような黒ボク土に炭素源窒素源を過剰添加することで、微生物による黒ボク土中の未利用リン画分の利用・吸収を促進させれば、微生物バイオマスリンの増加につながる可能性がある。そこで、本研究では、可給態リンが痕跡の黒ボク土に、CN過剰添加することで、微生物バイオマスリンが増加するかどうかを確認し、増加した微生物バイオマスリンが植物への可動性養分として機能するかどうかの検討を行った。【方法】供試黒ボク土は、可給態リンの量が異なる二戸市浄法寺町自然草地および岩手大学上田キャンパス上台草地より採取した。黒ボク土中の微生物バイオマス炭素、窒素およびリンは、クロロホルムくん蒸-抽出法により分析した。供試黒ボク土へのCN過剰添加実験では、C源としてグルコースを0、10、25、50 mg C/g 乾土となるよう土壌に添加し、N源である塩化アンモニウムは、C源添加量に対してC/N比が5となるように添加した。これら土壌を暗所25℃で培養し、培養期間中のCO₂発生量および培養終了時の微生物バイオマス炭素、窒素およびリンを測定した。一方、各黒ボク土にCNを過剰添加し10日間培養した土壌を準備し、この土壌でコマツナを栽培した。比較のため、無添加および化学肥料を添加した土壌を用いて同様に栽培した。栽培終了後、コマツナ地上部のリン含有量を測定した。【結果】CN過剰添加の実験では、C源N源の添加量の増加に伴い、微生物バイオマス炭素は増加したが、土壌呼吸速度および微生物バイオマス窒素は50 mg C・10 mg N添加区で若干減少した。微生物バイオマスリンでは、CN添加に伴う増加は認められなかった。また、微生物バイオマス炭素とqCO₂の間には有意な負の相関があり、CN過剰添加は微生物相の質的变化をもたらしたと考えられた。一方、CN添加処理した土壌を用いたコマツナの栽培試験では、微生物バイオマス炭素および窒素は増加したものの、同土壌ではコマツナは成長しなかった。これは、CN過剰添加による土壌のEC増加によるものと考えられた。

鈴木 一輝¹, Oguz Can Turgay³, 原田 直樹², 野中 昌法²¹新潟大学研究推進機構, ²新潟大学自然科学系, ³アンカラ大学農学部

本研究では土壌劣化の影響下にある乾燥地において、根圏細菌およびアーバスキュラー菌根菌（AM菌）の群集構造解析を通して、土壌劣化に伴う微生物群集構造の変化を捉えることを目的とした。AM菌は大部分の陸上植物の根に感染し共生器官を形成することでリンをはじめとする土壌栄養を宿主植物へと供給することが知られており、土壌劣化地域においては特に重要な土壌微生物の一つである。本研究では、トルコ中央部アンカラの乾燥地にて土壌劣化の程度が異なる3地域における自然植生に注目し、多年草3種、一年草4種の7植物種について、夏季および春季に根圏細菌およびAM菌群集構造のアンプリコンシーケンス解析を行った。根圏細菌群集構造について、土壌抽出DNAを鋳型に細菌の16S rDNAを増幅させた。MiSeqによる大量シーケンス解析の結果、平均約120,000シーケンスを配列決定し、属レベルで776 OTU（操作的分類単位）が得られた。細菌群集組成については、門レベルではFirmicutes門、Proteobacteria門、Actinobacteria門が優占しており、地点間、植物間で多少の変動は見られるものの、これら3つの門が相対存在量の80%程度を占めていた。属レベルでは*Bacillus*属（9%）、*Rubrobacter*属（7%）が優占していた。細菌群集組成を比較した結果、土壌劣化の程度が大きい地点では他とは異なる群集構造を示し、この傾向は特に春季植生で大きかった。AM菌群集構造について、細根抽出DNAを鋳型にAM菌配列を特異的に増幅させるためNested PCRを用いた。1st PCRとしてAM菌のLSU-ITS-SSU領域を増幅させ、2nd PCRでITS領域を増幅させた後、MiSeqによりアンプリコンシーケンス解析を行った。その結果、得られた配列の約80%がAM菌が属するGlomeromycota門となり、AM菌DNAを優先的に解析できることが示されたが、一部の試料で著しく低いAM菌多様性が示されたため、今後この手法によるバイアス等についてさらなる検討が必要である。春季植生では多様なAM菌（*Glomus*、*Gigaspora*、*Rhizophagus*、*Septoglomus*等9 OTU）が検出された。また、異なる植物種間で共有するAM菌のOTU数は土壌劣化の程度の小さい地点よりも中程度の地点で多い傾向がみられた。

江邊 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
近畿大・院生物理工

イネの籾殻を焼成して得られる燻炭は、土壤へ施肥することで作物の収量増加をもたらすことが知られている。その理由として土壤の通気性や保水性といった物理性の改善の他に、燻炭添加により菌根菌の感染率が向上することや、土壤微生物の増殖を促進することで植物生長に寄与することが報告されている。そこで我々は無機物である燻炭と微生物の関係に着目した。これまでに我々は燻炭と土壤微生物の関係を明らかにするため、燻炭存在下で活性が促進される微生物の探索を行い、燻炭を添加した寒天培地上で増殖が促進する*Bacillus*属細菌IA株を単離した。またIA株の液体培養において燻炭を添加することで増殖と孢子化、抗生物質生産を促進することを明らかにした。そこで本研究では燻炭が微生物の活性を促進するメカニズムの解明を目的とした。燻炭における活性促進効果が水溶性成分にも存在するか調べるため、燻炭5 g/L(w/v)を蒸留水に添加し高温高圧処理を行った後、上澄みを孔径0.2 μm のフィルターで濾過した燻炭抽出液で培地を調製しIA株の培養を行った。結果、燻炭抽出液は透過した茶褐色を呈し燻炭から水溶性成分が抽出された。燻炭抽出液で調製した培地でIA株の培養を行ったところ孢子化と抗生物質生産が促進された。しかし燻炭5 g/Lを添加した培養よりそれらの促進効果は低かった。次に燻炭抽出液中に含まれる物質の量を調べるため燻炭抽出液を凍結乾燥に供した。結果、燻炭抽出液20 mL中に約6 mgの物質が含まれていることが分かった。また燻炭抽出液の凍結乾燥物に蒸留水を添加したところ水溶性の画分と溶解しない不溶性の画分が生じた。これら画分を混合し培地に添加してIA株の培養を行ったところ、燻炭抽出液以上の孢子化と抗生物質生産量を示した。次に水溶性の画分と不溶性の画分を用いてそれぞれ培地を調製し、IA株の培養を行ったところ不溶性の画分を添加した培養において高い代謝促進効果を示した。以上の結果から燻炭抽出液中にもIA株の代謝を促進する物質が含まれているが、燻炭抽出液を凍結乾燥に供した後の方が活性促進効果は高かった。そしてその効果は不溶性の画分が重要であることを明らかにした。

居石 優子¹, 龍田 典子¹, 亀井 勇統², 上野 大介¹, 染谷 孝¹¹佐賀大・農, ²鹿県短・生活科学科

【目的】熊本県阿蘇地域では昔から草原の野草を採取し、飼料や敷料、堆肥原料、土壌マルチ資材として農業及び畜産に活用してきた。特に、野草を野積みして堆肥化した野草堆肥や、それを牛ふんに加えて製造した野草牛ふん堆肥を土壌に施用すると、植物土壌病害が出にくくなると言われてきた。そこで本研究では、その科学的な検証を行った。

【方法】野草堆肥と野草牛ふん堆肥、及び野草堆肥をマルチ施用ないし土壌還元消毒に用いたハウス土壌を2015年に計8点採取し、当研究室で開発した直接選抜培養法を用いて拮抗菌を検出した。すなわちタマネギ乾腐病菌 *Fusarium oxysporum* f. *sp. cepeae* D-194と試料懸濁液を培地に塗抹接種して培養し、発育阻止帯を形成したコロニーを分離・純化した。分離株の抗菌活性を *F. oxysporum* f. *sp. cepeae* D-194, G-177及びJ-159の3株を用いたディスク法により検定し、その陽性株についてAPIキット (シスメックス・バイオメニュー) 及び16S rRNA塩基配列を用いて菌種を同定した。抗菌物質は10 Lの培養液から溶媒抽出したのち、各種クロマトグラフィーによって精製した。

【結果及び考察】野草堆肥、野草牛ふん堆肥及びハウス土壌の試料計8点から計53株の拮抗性細菌を分離・純化した。これらのうち38株が *Bacillus* 属細菌、13株が放線菌に属し、2株はその他の菌種であった。また53株中46株 (86.8%) が抗菌活性を示し、うち29株が被験糸状菌3株に対して強い抗菌活性を示した。このことから、直接選抜培養法による一次スクリーニングの妥当性が検証された。拮抗性 *Bacillus* 属菌38株のうち25株は *Bacillus amyloliquefaciens* ないしその類縁種であった。拮抗性放線菌11株は *Streptomyces* 属菌の類縁種で、2株はその他の属であった。抗菌活性の強い *Bacillus* 属分離株から一株 (SY1-1) を選び、抗菌物質を抽出した。本菌株は菌体外に抗菌物質を分泌し、その生産の至適培養期間は3~4日間 (大量培養では1日間) であった。同株の10 L培養液から抗菌物質を抽出・精製し、最終的に17 mgの抗菌物質を得た。今後、抗菌物質の構造決定を行うとともに、同株等の土耕栽培試験による病害抑制効果を検証する。

坂本 唯乃, 龍田 典子, 居石 優子, 上野 大介, 染谷 孝
佐賀大・農

【背景および目的】阿蘇地域では、採草された野草は刈り干し草（野草ロール）として保管された後、牛馬の飼料や厩舎の敷料、マルチ資材として使用される他、野外に貯蔵して腐熟させた野草堆肥を、またはこれを牛ふんと混合して製造した野草牛ふん堆肥を田畑に施用している。当研究室による予備的研究により、野草堆肥および野草牛ふん堆肥には、植物病原菌に対する拮抗菌が高密度で含有することが判明し、「植物病害を低減する有機物資材」として有望である可能性が示された。しかし、これらの製造方法や野草ロールの使用方法是阿蘇地域の中でも多様である。そこで本研究では、様々な堆肥化施設や野草ロールのロットの違いなどを考慮して多くの試料を採取し、含有する拮抗菌数について比較検討することにより、適切な製造方法や使用方法について考察した。

【方法】阿蘇地域の8地点から、野草ロール7点、野草堆肥17点、野草牛ふん堆肥7点、野草マルチ施用土壌20点および対照区試料（野草無施用土壌など4点）、計55点を採取し、それらの理化学性を調べるとともに、各種細菌数を希釈平板法により測定した。中温菌をNutrient Agar培地により、また放線菌をGlycerin Asparagine Agar培地により、いずれも30℃、5日間培養し計数した。タマネギ乾腐病菌に対する拮抗菌数を、当研究室で開発した直接選抜培養法を用いて測定した。すなわち、被験糸状菌*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* D-194の胞子懸濁液と試料希釈懸濁液を上記2種の培地に各3連で塗抹接種した。これを30℃で5日間培養し、発育阻止円を形成したコロニーを拮抗菌として計数した。

【結果および考察】野草マルチ施用土壌20点のうち9点が拮抗菌を高密度（ $10^6 \sim 10^8$ cfu/g乾物）で含有していた。また、野草堆肥17点は室内貯蔵野草ロール7点よりも、拮抗菌数が数十倍から数千倍高かった。一方、野草牛ふん堆肥7点では拮抗菌数が $10^4 \sim 10^5$ cfu/g乾物と低く、これらでは、室内貯蔵野草を堆肥原料に用いていた。以上の結果から、野草ロールは野外貯蔵して堆肥化を促進させた方が、拮抗菌が増殖して高密度となり、植物病害低減への効果が高いと期待される。さらに、野草堆肥をハウス土壌にマルチ施用することで、拮抗菌が極めて高密度に集積することが判明した。

川内 智裕¹, 山野 優花², 吉崎 由美子³, 池永 誠³, 境 雅夫³¹鹿児島大学院連合農学研究科, ²鹿児島大学農, ³鹿児島大学学術研究院農

土壌微生物間には、多様な相互作用が存在しており、土壌管理などの違いによる環境条件の変化によって常に影響を受けている。したがって、この土壌微生物間の相互作用（ネットワーク）を理解し、そのネットワークの状況を的確に判断できれば土壌の生物性の評価につながることが期待される。近年、微生物の産生する揮発性有機化合物（VOCs）の多くは微生物間（さらに微生物と植物/動物間）に様々な作用を及ぼす情報化学物質（infochemicals）であるという知見が蓄積されてきている。そこで本研究では、土壌微生物由来のVOCsを網羅的に解析して土壌の生物性を評価するための解析方法について検討した。土壌中に存在する微量な微生物由来VOCsを測定するため、大容量ヘッドスペース（LVSH）法の適用を検討した。これは、試料を専用のガラス容器に入れ、その大容量のヘッドスペースガスを低温濃縮することでGC-MSへ導入する方法であり、試料そのままの状態の微量なVOCsを測定することが可能である。また、土壌空気には大量の水や二酸化炭素が存在するためヘッドスペースガスのGC-MS分析を障害するが、このLVSH法の濃縮方法ではこれらを除去してGC-MSへ導入することが可能である。採取した土壌試料をそのまま500mL容量の専用容器に入れ、土壌空气中に存在するVOCs成分をLVSH法によるGC-MSにて分析した。分析方法を最適化するため、ヘッドスペースガスの濃縮条件やGC-MS分析条件、土壌試料の量、土壌水分量の影響などを調べ、高感度で再現性の高い分析条件を検討した。その結果、ヘッドスペースガスの注入方法にはPulsed Vacuum Extraction 100ml×5回を用い、土壌試料の量は30g～50gとすることで、高い再現性でより多くのVOCs成分を検出することが可能となった。この方法を用いて様々な土壌のVOCsを測定した結果、平均して30種類のVOCs成分が検出され、そのVOCsの種類と存在比は土壌毎に異なっていた。すなわち、各土壌試料に異なるVOCsプロファイルが存在することが示された。さらに、植物根圏におけるVOCsの分析法について検討した結果、容器に入る幼植物であれば栽培ポットごとLVSH法で分析可能であり、根圏の土壌微生物由来VOCsおよび植物由来VOCsを同時に検出することが可能となった。

李 哲揆¹, 飯田 敏也¹, 中保 一浩², 大熊 盛也¹¹理研BRC, ²農研機構・野菜花き研究部門

土壤還元消毒法とは土壤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。これまでは廃糖蜜や低濃度エタノールを用いることで、病原菌が生残する土壤深層部（40cm以下）に対して高い消毒効果を示すことが報告されている。一方で、これらの資材は作業の煩雑さや資材コストの高さが普及拡大の妨げとなっている。我々はこれまで調味料生産過程のアミノ酸／核酸発酵副生物である糖含有珪藻土を用いた土壤還元消毒を行うことで、簡便にかつ低コストで、土壤深層部までの病原菌数を減らすことができることを示した。加えて、この資材を用いた土壤還元消毒は北海道から近畿までの様々な地域で、青枯病やネコブセンチュウ、褐色根腐れ病といった様々な植物病害に適応可能であることも明らかにした。ここでは、本資材を用いた消毒過程において、資材の分解や還元化に寄与すると考えられる土壤微生物への影響を明らかにするため、北海道から和歌山県まで7道県11地域のほ場を対象に土壤細菌群集構造を解析した。消毒は糖含有珪藻土（2t/10a）を土壤に混和・湛水後、ビニールで3週間程度被覆することにより実施した。2つの深度（0-30cm, 30-60cm）から消毒前後の土壤を採取しDNAを抽出後、16S rRNA遺伝子をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析に供した。また培養法およびMPN-PCR法を用いた、消毒前後の病原菌数を確認することで、還元消毒の成否を評価した。消毒後の土壤では微生物DNA量およびShannonの多様性指数が減少していた。Weighted-unifrac distanceを主座標分析で解析した結果、還元消毒成功土壤に特徴的な菌叢は見られなかった。しかし、Multi-level pattern analysisを用いた指標種分析の結果、還元消毒が成功した土壤では上層、下層ともにClostridiales細菌が増加していることが明らかになった。特にClostridium cluster IIIに属する細菌が増殖しており、この細菌群が還元消毒において重要な役割を担っていることが示唆された。

藤村 玲子¹, 磯部 一夫¹, 豊田 敦², 竹本 和広³, 荒井 渉⁴, 妹尾 啓史¹, 高見 英人⁴

¹東京大学, ²国立遺伝学研究所, ³九州工業大学, ⁴海洋研究開発機構

近年、メタゲノム情報から微生物生態系の代謝機能を明らかにする試みがなされている。本研究では、地理的に異なる3地点（山形・東京・熊本）の畑地および水田土壌の比較メタゲノム解析から、それぞれの土壌環境を特徴付ける微生物代謝機能ポテンシャルの検出を試みた。各土壌から得られたメタゲノム配列の中からそれぞれ300万のアミノ酸配列を抽出し、MAPLE（Metabolic and Physiological Potential Evaluator）システムを用いてKEGGデータベースの機能モジュールに基づく微生物代謝機能ポテンシャルを評価した。各サンプルで完成した機能モジュールの相対アバンダンスに対して多変量・分散解析を行った結果、モジュールアバンダンスの分布パターンは山形・東京・熊本という地域的な差異よりも畑地・水田という土地利用形態の差異を大きく反映していた。畑地と水田土壌でモジュールアバンダンスを比較すると、畑地土壌では同化的な窒素・硫黄代謝モジュール（Nitrate assimilation、Assimilatory nitrate reduction、Assimilatory sulfate reductionなど）が、水田土壌では異化的な窒素・硫黄代謝モジュール（Dissimilatory nitrate reduction、Dissimilatory sulfate reduction、Denitrificationなど）が高かった。さらに、畑地土壌ではMultidrug resistanceやアミノ酸合成系のモジュールが、水田土壌では金属元素やリンの輸送系モジュールのアバンダンスが高いという違いも見られた。また、Nitrogen fixationは水田土壌で高かったが、畑地土壌では極めて低いという結果だった。以上、機能モジュールに基づく土壌微生物代謝機能ポテンシャルの解析結果から、水田土壌では異化的な窒素・硫黄代謝系が高いという従来の知見を支持する結果が得られたとともに、新たな生物地球化学的知見が遺伝子に基づく機能的解析によって得られることが示唆された。

渡部 瑞季, 井上 綾, 斎藤 穂, 田代 幸寛, 酒井 謙二
九大院・生資環

【背景・目的】福岡県築上町ではヒトし尿から自家発酵熱型高温好気処理によって有機液肥を製造し、農地に還元利用する取り組みが行われている。有機液肥の利用は資源循環に繋がるが、環境保全との両立が重要であり、未だ有機液肥の施肥が土壌を含む環境におよぼす影響は分かっていない。そこで本研究では、有機液肥（液肥）および化成肥料（化肥）を施肥した水田の細菌群集構造を調べるとともに、各水田土壌の理化学特性と細菌群集構造の関連を調査することを目的とした。【材料及び方法】液肥および化肥をそれぞれ施肥した各水田土壌を対象とした。1回の採取につき各2か所(上流、下流)を三連ずつ、2016年6月～9月までの期間に、計6回採取した。DNA抽出、MiSeqによるシーケンスの後、USEARCHとQIIMEを用いて細菌群集構造解析を行った。さらに、各土壌中に共通する主要細菌のOTUについてそれぞれ土壌pHとの関連を調べた。【結果・考察】各水田土壌の優占門は占有率の高い順にProteobacteria、Acidobacteria、Actinobacteriaであり、どちらの水田においても施肥後日数によらず占有率は類似した。種レベルでは、肥料間で各OTUの占有率は異なり、特に、液肥施肥水田下流の主要細菌OTUは化肥水田と大きく異なった。また、液肥に存在したOTUの多くが液肥水田で検出された。よって、液肥中の細菌種の一部は施肥された水田土壌中でも存在することが分かった。さらに、液肥中に存在せず、液肥水田のみに存在するOTU数は化成肥料水田のみに存在するOTU数よりも多く、液肥施肥により他の細菌種の多様性にも影響をおよぼすことが示唆された。また、各水田の平均土壌pHは、液肥では6.8、化肥では7.1であった。各水田で共通する優占OTUの一部はそれぞれ占有率と土壌pHに正の相関関係($p<0.05$)を示した。以上の結果から、肥料の種類は、門レベルでは明らかな影響をおよぼさないが、種レベルでは差異を与えることが推察された。

金子 綾¹, 和田 奈津美², 鈴木 一輝³, 原田 直樹⁴, 野中 昌法⁴¹新潟大学大学院自然科学研究科, ²新潟大学農学部, ³新潟大学研究推進機構, ⁴新潟大学自然科学系

土壌肥沃度を高め、作物が健全に育つ環境を構築するためには、その土壌に適した施肥を行うことが求められる。土壌環境を改善する農法の一つに有機肥料の投入が挙げられる。土壌有機物含量を調整することで、土壌微生物活性の向上や土壌の理化学的環境の改善が期待されるが、その詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、有機水田を念頭に投入する有機質資材の種類や施用量の違いが土壌微生物群集構造と多様性に与える影響について、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いて検討した。水田圃場の土壌を用い、暗所にて前培養を行った後、無施肥区、稲わら施肥区、牛ふん堆肥施肥区を作製し、16週間暗所にて湛水条件で静置培養した。0, 1, 2, 4, 8および16週目の土壌から土壌DNAの抽出を行い、得られた土壌DNAを鋳型に細菌の16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をPCR増幅し、MiSeqを用いたアンプリコンシーケンス解析を行った。得られたリード数に基づいて細菌群集の類似度や多様度を求め、主成分分析およびクラスター解析を行い、土壌細菌叢の経時変化及び処理区間での違いについて検討した。主成分分析とクラスター解析の結果から、稲わら施肥区では無施肥区と牛ふん堆肥施肥区とは異なる細菌叢の変化が確認され、投入した有機質資材の違いが細菌群集に与える影響が経時的に示された。さらに培養後期では全処理区が同じクラスター内に位置していたことから、時間経過によって各処理区で類似した細菌叢に収束したと考えられた。また属レベルの細菌群集組成では*Clostridium*属、*Desulfitobacterium*属、*Caloamator*属、*Planoccus*属、*Geobacter*属、*Bacillus*属などが優占しており、特に稲わら施肥区では*Clostridium*属の存在率が最も高いことが示された。稲わらは易分解性物質であることから、無施肥区又は牛ふん堆肥施肥区とは異なる細菌叢の変化が示されたのではないかと考えられる。

野口 愛^{1,2}, 桐山 隆³, 梅本 英之³, 稲葉 清弘³, 本多 了², 合間 修一⁴
¹国環研・リ健C, ²金沢大・理工, ³石川県・農総研, ⁴(株)サクシード

竹はその成長の速さや加工のしやすさから広く親しまれてきたが、近年では竹の利用が減少しており、管理の行き届いていない竹林や、伐採した竹材の利用が課題となっている。竹は細かく粉碎し（竹チップ化）、水分等と混合すると発酵が起こり、50～60℃の温度が水分補給や攪拌により1年以上持続する例が報告されている。しかしながら、本系において発酵状態と菌叢の関係性に関する知見が不足している。そこで本研究では、発酵槽の温度と微生物叢を経時的に発酵状態に合わせ解析を行った。石川県農林総合研究センター農業試験場（石川県金沢市）に設置のビニールハウスに発酵槽（30 m³）を設置した。2016年10月28日に、竹を1-2 cm角に粉碎した竹チップ30 m³、菜種油かす 240 kg、米ぬか 150 kg、杉皮 3 m³、好熱菌資材3 m³を混合し、含水率約60%となるよう給水し発酵を開始した。発酵槽の温度は2016年11月25日より発酵槽表層から深さ50 cmの点を5点、30分毎に測定した。また、温度測定地点の付近の堆肥を採取し、微生物叢の解析を行った。試料の採取は2016年10月28日、11月25日、2017年1月13日、2月7日に行った。微生物叢解析は細菌16S rRNA遺伝子のV3・V4領域を対象として行った。2016年11月26日より2017年2月8日までの発酵槽の平均温度は、中心部から0.8 mの地点で50.3℃と最も高くなっており、発酵槽の外側（中心部から1.5 m）と中心部で大きな差はなかった（47.6～48.0℃）。2017年1月6日、1月10日、2月2日に発酵槽に給水したことにより槽内の温度が低下しているが、その後7日程度で温度が戻っており、槽内の発酵は安定していると考えられる。発酵槽の微生物叢に関しては、得られた遺伝子配列に対し相同性97%以上の配列でOTUを形成し解析した結果、発酵開始時は構成しているOTUが93であったのに対し、2016年11月25日には平均で148、2017年1月13日には190、2017年2月7日には203のOTUで構成されており、多様性が増していた。ただし、存在率が0.1%以上のものを解析対象とした。一方で、標準偏差は開始時を除いて35、22、19となっており、5点の微生物構造がより類似した形に収束していた。

小西 智之¹, 坂井 沙織², 橋本 賢一³, 川崎 寿³¹東京電機大院・先科技, ²東京電機大院工・物質工, ³東京電機大学・工

農作物と微生物の相互作用に関する研究開発と農業への適用は19世紀半ばの植物病原菌研究にはじまり、20世紀前半にかけては根粒菌や菌根菌に代表される植物に有用な微生物の基礎研究が行われてきた。1950年代以降、有用な微生物の研究は実用段階に入り、微生物を用いた生物農薬や微生物資材の販売が行われた。自然環境に対する影響が少ない微生物農薬はもともと自然界に存在しているものが多く、これらを活用した植物病害の生物的防除は、化学農薬の近年問題となっている薬剤耐性病原菌の出現や農薬残留の問題等を解決するための有力な病害防除手段として注目されている。このように農業は作物の品種改良や水耕栽培といった手法で農地面積当たりの収穫量の伸ばしてきている以外にも生物農薬や微生物資材等といった微生物研究によって化学農薬で問題となっている点を解決し収穫量を伸ばしてきている。我々は農地の回転率を上げることで面積当たりの収穫量を伸ばすことを考えている。回転率を上げるには植物を育てる過程に必要な栄養素17元素が不可欠である。このうち9元素は、炭素、酸素、水素、窒素、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウムで多量必須元素であり、8元素は、鉄、マンガン、銅、亜鉛、ホウ素、塩素、モリブデン、ニッケルで微量必須元素、これらが必須栄養素と呼ばれている。これら17元素のうち窒素、リン、硫黄などといったものが土壌中の微生物を介して植物に吸収されている。また、他にも立枯病や連作障害といった植物が病気や生育不良にならないことも収穫量を伸ばすのには不可欠である。このように土壌中には植物の生育に役に立つ微生物、菌根菌などといったものから、立枯病などといった植物を病気にする病原菌が存在する。次世代シーケンサを用いた16Sや18Sのアンプリコン解析によって農地の土壌の微生物叢の分析を行った。植物の生育状況や土壌状況によって微生物叢の違いが見られた。

海野 佑介¹, 城山 カンナ², 天知 誠吾², 武田 晃¹¹環科技研, ²千葉大・園芸

長半減期放射性核種である¹²⁹I（半減期約1600万年）は、原子力施設から環境中に放出され、一部は周辺土壌に沈着する。土壌溶液中ヨウ素濃度の増減は、ヨウ素の環境動態に大きな影響を与える為、環境中における放射性ヨウ素の挙動を理解する上で、実態を把握する事は極めて重要である。これまでに、表層土壌に添加した無機態ヨウ素は、その大部分が有機態ヨウ素に形態変化する事が確認されている。土壌中に存在する無機態ヨウ素の主要形態であるヨウ化物イオン（I⁻）からの有機態ヨウ素の生成には、ヨウ化物イオン酸化細菌による酸化作用の寄与が指摘されてきた。しかしこれまでは、どのような微生物が有する、どのようなヨウ化物イオン酸化酵素が、本過程に寄与するのかについては、明らかとされていなかった。本研究では、2018年度竣工予定の核燃料再処理施設（青森県六ヶ所村）近傍の放牧地を対象として、土壌中ヨウ素濃度と土壌溶液中存在形態別ヨウ素濃度、ヨウ化物イオン酸化酵素活性、細菌群集構造、及びヨウ化物イオン酸化酵素遺伝子様配列の分布について解析を行い、ヨウ素の溶解性とこれに関与する土壌微生物特性を調査した。

放牧地の土壌を5 cm間隔で層別に深度50 cm まで採取し、供試試料とした。土壌中全ヨウ素濃度は、0～5 cmが最も低く、20～50 cmにかけて高い値を示した。一方で、土壌溶液中の全ヨウ素濃度は0～10 cmが高く、深度が深まるにつれ低下傾向を示した。また土壌溶液中の有機態ヨウ素濃度は全ヨウ素濃度の40～50 %を占め、両者は高い正の相関関係を示した。これらの結果から、表層土壌においてヨウ素の溶出性が高まるのは、土壌溶液中有機態ヨウ素濃度が高まる為である事が示唆された。ヨウ化物イオン酸化酵素活性は0～5 cmの土壌で最も高く、5 cm以深においては低い値を示した。また細菌群集構造解析の結果、これまでに報告されているAlphaproteobacteriaに属するヨウ化物イオン酸化細菌と相同性の高い配列の相対的存在比率が、0～5 cmの土壌で高く、深度が深まると低下する事が示された。さらに、0～5 cmの土壌からはAlphaproteobacteriaに属する細菌の保有するヨウ化物イオン酸化酵素様配列が検出されたが、5 cm以深では検出されなかった。これらの結果から、Alphaproteobacteriaに属するヨウ化物イオン酸化細菌が、土壌中のI⁻を酸化し、溶存有機態ヨウ素の生成に寄与する事で、土壌溶液中ヨウ素濃度が高まる事が示唆された。

杉山 智美¹, 入江 満美¹, 夏秋 啓子¹, 野口 雅子², 吉田 重信²¹東京農大・院農, ²農研機構・中央農研

【背景・目的】牛ふんの発酵処理残渣である牛ふんメタン発酵消化液（以下、消化液）は、バイオマス利活用の観点から今後液肥としての利用が望まれる。演者らは、消化液の土壌施用により、ホウレンソウの生育が良好となるだけでなく、ホウレンソウ萎凋病の発生が抑制されることをこれまでに明らかにしてきた。こうした消化液の生育促進効果や発病抑制効果の要因の解明に資するため、本研究では、消化液の土壌施用が土壌微生物の群集構造に及ぼす影響を調査した。

【方法】供試土壌として黒ボク土を用い、健全土壌とホウレンソウ萎凋病菌（*Fos*）のbud-cellsを混和した汚染土壌を用意した。さらに、各土壌に対し湿重で8%の消化液を施用した区も設け、最終的に無処理区、消化液区、*Fos*区、*Fos*+消化液区の土壌をそれぞれ作成した。各区でホウレンソウを30日間栽培し、萎凋病の発生状況を調査するとともに、各区から一部土壌を継続的に採取し、抽出した土壌DNAを鋳型としてPCR-DGGE法により土壌細菌、糸状菌相を解析した。

【結果・考察】栽培30日後の*Fos*区および*Fos*+消化液区における苗の発病株率を調べた結果、それぞれ40%、30%の苗で発病が確認され、消化液の施用により発病が若干軽減される傾向であった。こうした発病抑制条件下において、DGGEプロファイルに基づき各区の多様性指数を算出した結果、消化液の施用による特徴は見られず、いずれの区でも多様性はほぼ同程度であった。しかし、主成分分析の結果では、糸状菌相および細菌相ともに消化液施用の有無で群集構造が異なり、消化液の施用により特徴的に出現するバンドの存在等が示唆された。このうち、土壌細菌相において消化液の施用により強く出現したバンドは、消化液由来DNAのDGGEプロファイル中には明確に認められなかったことから、これらは土壌中に生息している細菌種に由来していると考えられた。また、*Fos*に相当するバンドは、播種10日目では*Fos*+消化液区でその相対強度が*Fos*区に比べて有意に低下したが、30日目では、両区で有意差は見られなくなった。以上の結果から、消化液の土壌施用により土壌微生物群集は変化し、*Fos*の生息に対しても影響を及ぼす可能性が考えられた。今後は、消化液の施用により特徴的に出現したバンドの微生物種を明らかにするとともに、それらの発病抑制や生育促進に与える影響を検討する予定である。

星 光輝¹, 橋本 知義², 西澤 智康¹, 太田 寛行¹
¹茨城大・農, ²中央農研

土壌消毒に汎用されてきた臭化メチルがオゾン層破壊物質に指定されたため、臭化メチル剤の代替技術の一つとして太陽熱土壌消毒法が注目されている。しかし、太陽熱消毒処理期間が不明確のため、その効果の程度が判断しにくい。本研究では太陽熱消毒効果の可視化を目的とし、土壌微生物の群集構造や活性に与える影響を明らかにするため微生物群集構造解析により太陽熱消毒の影響効果を評価した。代表的な土壌病原菌を用いた先行研究で地温—積算時間—死滅率に関するデータが得られている中央農業研究センター内の畑地実験圃場を用いた。調査は時期別に4回（処理前、処理中、処理直後、処理1ヶ月後）土壌を採取して行った。圃場をポリエチレンフィルムで被覆して15cm深度の地温を計測し、それぞれの処理区（裸地区、通常マルチ区、通路マルチ区、二重マルチ区）の土壌中の積算温度を測定した。土壌生物性分析は、希釈平板法による生菌数測定、ATPを指標とした土壌バイオマスの測定、MPN法による硝化菌の計数測定を行った。また、土壌試料から抽出したDNAを用いて16S rRNA遺伝子のPCR増幅産物を調製し、末端制限断片長多型（T-RFLP）解析を行った。T-RFLPプロファイルに基づく多変量解析から土壌細菌群集の動態を分析した。土壌中の積算温度は、裸地区が最も低く、二重マルチ区が最も高い値を示し、二重マルチ区のみ40℃以上の地温を確保した。細菌、糸状菌、硝化菌の各生菌数は地温の温度変化に伴い、処理直後に最も少なくなり、処理終了から次第に回復する傾向が見られた。この傾向は糸状菌数とアンモニア酸化細菌数において特に顕著であった。細菌の群集構造の変化をT-RFLPのプロファイルから判断すると、裸地区では消毒前～消毒終了後1ヶ月の間で類似していたが、二重マルチ区ではそれぞれの採取時期で異なっていた。一方、糸状菌の群集構造は、裸地区と二重マルチ区ともに土壌採取時期によって異なる群集構造を示した。本研究から、太陽熱消毒として期待される深さ15cmで、より高い地温を確保することにより、細菌と糸状菌の群集構造および硝化菌数に影響を及ぼすことが示された。

（はじめに）土壌病害は、防除が困難なものが多い。また、最近、転換畑における、畑作物の経年的収量低下が問題になっているが、潜在的連作障害の可能性もあるが、確かめられていない。土壌消毒は、土壌病害防止といった実用的な面の他に、特定の現象への土壌微生物の関与を確認するためにも必要な、研究のための手段でもある。土壌殺菌法は多数あるが、薬剤による土壌殺菌では、使用する薬剤が環境や散布者に有害なものが多く、使用が禁止されている薬剤もある。そこで、物理的な、熱を使った消毒が望ましいと思われる。しかし、各種の土壌加熱消毒があるものの、いずれも使用条件が制限されていることが多い。太陽熱消毒は、夏季のハウス内でしか使えないし、熱水消毒も給水源が必要である。そこで、条件の制約が少なく、安価で簡単にできる土壌加熱消毒法として、圃場に掘った穴の中での固形燃料を燃焼させ、その燃焼熱による加熱を用いた土壌加熱消毒法を考案したので提案する。（方法）１）土壌加熱法：試験圃場に約10cm深の穴（加熱穴）を掘り、固形燃料（メタ）を底に置いて着火し、その上に着火成型炭を乗せた。約4時間で、炭はすべて灰になった。２）土壌温度測定：２つの加熱穴を50cm離して作り、その中間のところと、片方から10cm離れたところ、5cm離れた3地点および、対照として加熱穴から50cm離れた地点の合計4地点で、土壌中温度の変化を測定した。測定には、「おんどとり」を用いた。センサーは、それぞれの測定地点の10cm深さに設置した。処理を実施した際の土壌の温度変化についても測定して報告し、土壌中の温度変化の結果から土壌消毒の可能性を考察する。

松野 美里¹, 池永 誠¹, 富瀨 毅², 森 清文², 菅 康弘³, 境 雅夫¹¹鹿児島大学, ²鹿児島県農業開発総合センター, ³長崎県農林技術開発センター

【背景・目的】 ジャガイモそうか病は、数種の*Streptomyces*属放線菌が原因菌として塊茎表皮に病斑を形成する土壤病害である。ジャガイモ塊茎の表皮には、そうか病菌以外にも多様な細菌種が定着しており、塊茎上のこれらの細菌間の相互作用はそうか病の発病程度にも影響を及ぼすと考えられる。したがって、塊茎表皮の細菌群を制御することにより、そうか病菌を抑制できる可能性がある。また、いくつかの有機資材の施用についてはジャガイモそうか病の軽減効果が報告されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、ジャガイモ塊茎表皮の細菌群集構造を解析し、有機資材施用が塊茎表皮に生息する細菌集団に及ぼす影響について調査した。【方法】 そうか病抑制効果が報告されている有機資材として「米ぬか」の土壌施用の影響を調査した。ジャガイモ（品種：ニシユタカ）を鹿児島県農業開発総合センターおよび長崎県農林技術開発センターの試験圃場（いずれもそうか病発生土壌）において、米ぬか施用区と対照区で栽培した。塊茎肥大初期の塊茎を採取し、その塊茎の表皮から直接DNAを抽出した。細菌群集構造は、16S rRNA遺伝子のアンプリコンシークエンスにて解析し、植物DNAの混入による解析効率低下を防ぐため、LNAオリゴを用いたPCRクランプ技術をジャガイモ植物に最適化して実施した。また、細菌群集構造の解析結果に基づいてそうか病菌（*Streptomyces scabiei*）に対する拮抗菌の探索を行った。【結果・考察】 ジャガイモ塊茎表皮の細菌群集構造を米ぬか施用区と対照区で比較した結果、多くの細菌種は栽培地域や栽培期（春作・秋作）ごとに変動していたが、一部の細菌種は米ぬか施用区において特徴的な変動を示すことが分かった。*Bacillus* 属や *Agrobacterium* 属の細菌は、異なる地域の栽培でも共通して米ぬか施用区の塊茎において増加した。一方で、*Chryseobacterium* 属細菌のように米ぬか施用区の塊茎において共通して減少する細菌種が存在した。さらに、ジャガイモ塊茎表皮から分離した細菌を調査した結果、拮抗性を示す *Bacillus* 属細菌株が多数分離できることが分かった。以上の結果から、米ぬかの土壌施用によるそうか病抑制と *Bacillus* 属細菌の塊茎表皮での増加との関連性が示唆された。

鶴見 拓哉¹, 渡部 悠樹¹, 太田 和秀¹, 森田 更紗², 磯部 百葉², 高階 史章¹, 金田 吉弘¹, 古屋 廣光¹, 佐藤 孝¹
¹秋田県立大・生物資源, ²秋田県立大・院生物資源

【目的】ダイズ黒根腐病は*Calonectria ilicicola*によって引き起こされる土壌伝染性の立枯性病害で、一般的にダイズを連作している圃場で発生しやすい。しかし、秋田県大館市に27年ダイズ連作をしていても収量を270kg/10a以上に維持し、ダイズ黒根腐病をはじめとした病害がほとんど発生していない長期ダイズ連作圃場がある。この圃場では、特定の乾燥鶏糞を毎年200kg/10a施用して27年間ダイズを連作しているが、乾燥鶏糞の施用とダイズ黒根腐病の発生との関連については明らかではない。そこで本研究では、長期ダイズ連作圃場で施用されている乾燥鶏糞にダイズ黒根腐病の抑制効果があるのではと考え、乾燥鶏糞がダイズ黒根腐病菌の増殖へ及ぼす影響を検討した。【方法】1) 長期ダイズ連作圃場で施用されている乾燥鶏糞をオートクレーブ滅菌したものと、していないものを用意して、PDA培地上にダイズ黒根腐病菌と並べて置き、インキュベーターで25℃、5日間対峙培養した。2) 乾燥鶏糞から分離した細菌を用いて1)と同様にPDA培地上でダイズ黒根腐病菌と対峙試験を行い、分離した細菌によるダイズ黒根腐病菌の増殖抑制効果を解析した。3) 乾燥鶏糞から分離したダイズ黒根腐病の増殖抑制効果のある3菌株について16S-rRNA遺伝子の塩基配列を解読して同定を行った。【結果と考察】1) 滅菌処理した乾燥鶏糞ではダイズ黒根腐病菌の増殖抑制効果はみられなかったが、無処理の乾燥鶏糞では増殖抑制効果がみられた。このことからダイズ黒根腐病菌の増殖抑制には乾燥鶏糞に元々含有する物質（化合物）ではなく、微生物の作用が影響していると考えられた。2) 乾燥鶏糞から分離された16菌株の細菌のうち3菌株でダイズ黒根腐病菌の増殖抑制効果がみられた。顕微鏡で観察してみると、細菌がダイズ黒根腐病菌の菌糸の伸長を抑制していた。このことから、分離した3菌株にはダイズ黒根腐病菌の増殖抑制効果があると考えられた。3) 増殖抑制効果のあった細菌3菌株について同定した結果、2菌株が“*Bacillus subtilis*”、残りの1菌株が“*Bacillus amyloiquefaciens*”であった。以上から、長期ダイズ連作圃場でダイズ黒根腐病などの病害が少ない理由の一つは、その圃場で施用されている乾燥鶏糞にダイズ黒根腐病を抑制する効果があり、乾燥鶏糞中に生存する*Bacillus*属菌がダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制している可能性が示唆された。

森田 更紗¹, 鶴見 拓哉², 磯部 百葉¹, 高階 史章², 金田 吉弘², 見城 貴志³, 飯塚 美由紀³, 浅野 智孝³, 佐藤 孝²
¹秋田県立大学・院生物資源, ²秋田県立大学・生物資源, ³朝日工業 (株)

[目的]ダイズ黒根腐病は、ダイズ作付年数が多い圃場で発生しやすく、防除技術が確立されていないため、深刻な問題となっている。本研究グループでは、ダイズ黒根腐病菌(*Calonectria ilicicola*)の増殖を抑制する*Bucillus*属の細菌 (以下抑制菌) を3菌株単離した。これらの抑制菌は乾燥鶏糞から単離されており、支持体として乾燥鶏糞を用いた資材を開発できる可能性がある。しかし、これらの抑制菌の黒根腐病菌増殖抑制メカニズムや増殖特性は不明である。また、抑制菌を用いた資材の製造にあたり、抑制菌を乾燥鶏糞と混合して加熱乾燥させる必要があるが、抑制菌の熱耐性は調べられていない。そこで本研究では、単離した抑制菌の黒根腐病菌増殖抑制強度や増殖特性、熱耐性を検討した。[方法]PDA培地上で黒根腐病菌と抑制菌の対峙培養を行い、菌株ごとの黒根腐病菌増殖抑制強度を調べた。また、LB培地のpHを6段階 (pH5.0・6.0・6.5・7.0・8.0・9.0) に設定し、 1×10^2 cells/mlの菌液を植菌して35°Cで12時間培養を行い、増殖特性を調べた。さらに、鶏糞を使用した資材の利用を前提として、抑制菌 1×10^6 cells/mlを混合した鶏糞 (重量比5%) に対して約300°C (品温70~85°C) で加熱処理を行い、鶏糞中での抑制菌の生存性を調査した。[結果および考察]対峙培養の結果、黒根腐病菌の菌糸を取り囲むように増殖して菌糸の伸長を抑制する菌株や黒根腐病菌コロニーの周辺にハローを形成する菌株が確認された。これは、菌株ごとに黒根腐病菌の増殖を抑制する仕組みが異なっていることを示している。また、pHの違いによる抑制菌の増殖の違いを調べたところ、pH6.0~7.0の間では他のpHと比べて大きなコロニーが観察されたことから、この範囲のpHが抑制菌の至適pHであることが明らかになった。このpHの範囲にはダイズの生育における至適pHが含まれており、ダイズ作付圃場での応用が期待できる。また、抑制菌混合鶏糞における菌密度は、加熱処理後においても 1×10^4 cells/gの菌数を確保できることがわかった。以上のことから、分離した抑制菌の菌株ごとに黒根腐病菌増殖抑制能力は異なるが、熱耐性を併せ持ち、抑制菌はダイズ栽培用の資材としての利用適性があると考えられた。

中村 春香¹, 坂本 淳², 横山 和平¹¹山口大学院, ²ジェイカムアグリ株式会社

1. 研究背景

アブラナ科ネコブ病は、緩効性窒素肥料であるCDU施肥による発病抑止が経験的に知られている。しかしその抑止の原因とメカニズムは未だ解明されておらず、再現性に乏しい。昨年度、CDU施肥済み滅菌病土で育苗したハクサイ苗を、CDU施肥後1週間前培養した病土を充填したポットに移植(対照区は尿素施肥)して効果を検証したが、尿素施肥区の発病指数が期待値を大きく下回ったことと、CDU施肥区は1株だけ激しく発病していたため、CDU施肥による効果が不明瞭であったので、再検討するとともに、CDU分解菌*Rhodococcus* HNによる発病抑止効果を検討した。

2. ブロッコリーネコブ病発病圃場の土壌を用いた栽培

滅菌病土で育苗したハクサイ苗を、CDU施肥した生病土を充填したポットに移植した(対照区は尿素施肥)。なお、移植直後の感染を防ぐ為、育苗したハクサイ苗は土塊の外に根が伸長する前に移植した。CDU施肥区では尿素施肥区に比べ根基部への感染が見られず、発病が著しく抑制された。このことから、CDU施肥は、ネコブ病感染過程に何らかの影響を及ぼしたことが考えられた。

3. CDU分解菌のネコブ病菌休眠孢子への影響

CDU分解菌*Rhodococcus* HN株をUV照射し、*Alternaria solani*に対する生育抑制効果が親株(WT)より強いA、K株を単離した。なお、K株はCDU分解能を喪失した。WT株、A株、K株を単独、あるいは2株ずつの組み合わせで、生理食塩水で調製したCDU飽和溶液中で休眠孢子と混合した。4日間培養し、エバンスブルー染色法で休眠孢子的生死を判定した。

単独ではA株、K株、WT株の順に死孢子率が高かった。WT株は徐々に死孢子率が増加し、A株とK株のみでは2日目まで増加し頭打ちとなった。一方、2株混合ではWT+A株接種区が最も死孢子率が高かったが、どの処理区も単独接種区ほどの効果は得られなかった。また、死孢子率は高くても10~20%程度であった。

以上のように、CDU分解菌がネコブ病菌休眠孢子に直接作用することが確認されたが、栽培実験結果のような顕著な発病抑止効果を得るためには一次・二次遊走子などへの作用が主であると考えられる。

Keisuke Tomioka, Akira Kawaguchi, Akira Masunaka, Hiroyuki Sekiguchi, Koji Nomiyama, Shinsuke Mori
WARC/NARO

Poor seedling establishment is sometimes observed in cultivation of rice through direct sowing of iron-coated seeds into flooded fields, although the sowing mitigates some infective diseases as well as contributes to labor-saving and low-cost production of the crop (Inoue et al. 2009; Mori et al. 2014; Yamauchi 2012). Mycelial development of a filamentous fungus, *Fusicolla acetilerea* [Syn. *Fusarium merismoides* var. *acetilereum*] (Gräfenhan et al. 2011), on the surface of the seeds under flooded conditions is often recognized in our trial paddy fields (Mori et al. 2014, 2015). When healthy iron-coated seeds of rice (cv. Koshihikari) immersed in conidial suspension of a representative isolate of *F. acetilerea* at 24-26°C for 2 days were grown under submerged conditions in climate chambers controlled at 30°C under 12 h light (12 h darkness), they tended to be poor for seedling establishment as well as the mycelial development of the fungus on the seeds was reproduced. But, the tendency seemed not to be symptom of an infective disease, and growth of the seeds was estimated to be indirectly inhibited by the isolate. Decrease of oxidation-reduction potential in soils around direct-seeded rice under submerged conditions leads to poor seedling establishment (Mori et al. 2015). *Fusarium merismoides* may promote the decrease around iron-coated rice seeds to inhibit their growth.

芦川 基¹, 加来 伸夫¹, 上木 勝司¹, 上木 厚子¹, 渡部 徹¹, Pham Duy Dong², 渡邊 一哉³

¹山形大学農学部, ²岩手大学大学院農学研究科, ³東京薬科大学生命科学部

再生可能エネルギー生産システムの1つである微生物燃料電池(microbial fuel cell; MFC)は、電流発生微生物の機能を利用してバイオマスを直接電気エネルギーに変換することができる。水田に設置したMFC(paddy field MFC; PF-MFC)は、電気生産と食料生産を並行して行うことができる利点を持つ。また、電流発生微生物は、温室効果ガスであるメタンを生成するメタン生成古細菌と電子をめぐって競合関係にあると考えられ、PF-MFCを設置することで水田からのメタン放出を抑制できる可能性がある。本研究では、PF-MFCが水田土壌中の有機物分解や水田からのメタン放出に与える影響を明らかにするとともに、植物の種類がMFCの発電量に与える影響について明らかにすることを目的とした。水田土壌を充填したポットに、電極を設置して発電させた閉回路区、電極を設置したが発電しない開回路区、電極を設置しない電極非設置区を作成し、MFCがメタン放出に与える影響を調べた。実験は化学肥料のみ、化学肥料と稲わら、化学肥料と堆肥を施用した条件で行い、肥料の影響についても調べた。メタン放出量はチャンバー法により調べた。また、メディウム瓶を用いて植物無しの条件で小型MFCを作成し、MFCが水田土壌中における有機物分解やメタン生成に与える影響について調べた。植物の種類が発電量に与える影響については、イネを含む24種類の植物を栽植したバーミキュライト充填ポットにMFCを設置して発電量を比較することで調べた。メタン濃度はガスクロマトグラフで測定し、電圧は1000Ωの抵抗を用いた際の電圧をデータロガーで記録した。ポット試験では、肥料の違いに関わらず、PF-MFCの設置は土壌Ehの低下を促進し、水田からのメタン放出を増大させる傾向があった。一方、小型MFCを用いた実験では、電極の設置により水田土壌中におけるメタン生成は抑制された。また、MFCの設置は、水田土壌中における有機物分解を促進していた。水田からのメタン放出量が増大した理由については、微生物群集構造解析を含めた詳細な研究が必要である。イネを含む24種類の植物を用いたMFC実験では、ほぼ全ての植物において発電が観察されたが、イネを用いたMFCで最も活発に発電が進行し、植物の種類が発電に大きく影響することが明らかになった。

Annisa Nur Lathifah^{1, 2}, Hirano Akinori², Yong Guo², Tomoyasu Nishizawa^{1, 2}, Takashi Kamijo⁴, Kazuhiko Narisawa^{1, 2}, Irfan D. Prijambada³, Hiroyuki Ohta^{1, 2}

¹United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan, ²Ibaraki University College of Agriculture, 3-21-1 Chuou, Ami-machi, Ibaraki, Japan, ³Graduate School of Biotechnology, University of Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia, ⁴Faculty of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

Our previous study revealed that *Arthrobacter* spp. were frequently isolated from the volcanic deposits of Mt. Merapi in Indonesia and Miyake-jima, Japan. It can be speculated that the occurrence of *Arthrobacter* is characteristic of the early microbial ecosystem development accompanied with vegetation cover. Although *Arthrobacter* is commonly detected in the culturable microbial communities of terrestrial environments, there is a little knowledge about their taxonomy and ecology in volcanic environments. The objective of this study was to examine the phylogenetic, physiological, and biochemical characteristics of our *Arthrobacter* isolates from these environments. Six isolates (BRU I 8, BRU I 20, BRU 39, BRU 23, BRU 32, BRU 37) from the Mt. Merapi volcanic deposit and 5 isolates (MY 31, MY IG7R10, MY IG7R3-3, MY R2, MY E2) from the Miyake-jima ones were subjected to phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene and phenotypic characterization. The phylogenetic analysis revealed that although the 8 isolates were closely related with any of *Arthrobacter bambusae*, *Arthrobacter gyeryongensis*, and *Arthrobacter nicotinovorans*, the other 3 BRU isolates (BRU 23, BRU 32, BRU 37) were distantly related to known species in the genus *Arthrobacter*. Further analyses are now in progress to examine their physiological traits to grow in the volcanic environments.

河内 護之, 手塚 武揚, 妹尾 啓史, 大西 康夫
東大院・農生科

放線菌は、原核微生物でありながら複雑な形態分化能と多様な二次代謝物生産能を有している。しかしながら、これまでの放線菌の生理学的研究は、寒天培地を用いた固体培養又は、液体培養を用いて実施されてきた為、主要な単離源である土壌中での放線菌の生理・生態は、ほぼ不明である。そこで、我々の研究室で形態分化や二次代謝の制御機構を解析してきた

Streptomyces griseus 用い、分子生物学的アプローチが可能な土壌培養実験系の構築を試みた。

まず、*S. griseus*の生育しやすい土壌を、(i) 東大生態調和農学機構圃場の黒ボク土、(ii) 東大千葉演習林の褐色森林土、(iii) 京大標茶演習林の褐色森林土、(iv) 新潟県農業総合研究所圃場の灰色低地土から選抜した。土壌は、2 mmメッシュを通した細土をオートクレーブ滅菌して用いた(以下滅菌土壌)。2 gの滅菌土壌を15 mlチューブに分注し、最大容水量の50%になるよう胞子液を添加し1週間28℃で培養した。培養後、実体顕微鏡を用いて観察した結果、土壌(iv)で特に旺盛な生育が見られた。さらに走査型電子顕微鏡で観察した結果、胞子形成が確認され、実際に土壌団粒上で*S. griseus*が形態分化している様子が観察できた。

続いて、滅菌土壌培養での*S. griseus*の分子生物学的解析実施の為、核酸抽出法を検討した。まずDNA抽出法について検討した結果、PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) を用いて抽出できた。続いて、RNA抽出法について検討を行った。RNA抽出は、農研機構生物機能利用研究部門藤井らの方法¹⁾を参考に、カゼイン添加により土壌へのRNAの吸着を低減する方法を適用した。その結果、RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MoBio)を用いて、RNAが精製できた。さらに、RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MoBio) を用いることで、RNAとDNAの同時精製が可能となった。今後、土壌培養での放線菌の生理・生態を、培養過程のトランスクリプトームの変化に着目し解析する予定である。

1)Wang Y. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 96 (3), 793-802

鈴木 美有, 春日 郁朗, 栗栖 太, 古米 弘明
東京大・院工

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ろ過では有機物の活性炭への吸着と共に、活性炭に付着した微生物による生分解性有機物（Biodegradable Organic Matter : BOM）の分解が進行するが、BACろ過層で生分解される有機物の組成は明らかになっていない。そこで本研究では、BACろ過において除去されうる未知のBOMの組成を分子レベルで評価するために、電場型フーリエ変換（Orbitrap）質量分析計の適用を試みた。2016年11月及び12月に、国内の浄水場からオゾン処理水及びBAC処理水を採水し、滅菌したオゾン処理水にBACろ過水を 10^3 cells/mL程度になるように植種し、25°Cで6日間培養する生分解実験を行った。培養前後の試料中の溶存有機物を固相抽出し、Orbitrap質量分析計による分析（ネガティブイオンモード）に供した。培養後にピーク強度が30%以上減少した分子を、BACろ過水に含まれる微生物が生分解したものとみなした。また、これらのBOM分子の浄水処理工程における挙動を観察するため、各工程水を採水し、同様にOrbitrap質量分析計で分析した。生分解実験において、両月とも全菌数は 10^6 cells/mL程度まで増加し、BACろ過水中の微生物がオゾン処理水中のBOMを利用して増殖したと考えられた。培養前後の各分子のピーク強度の減少を調べたところ、11月は20分子、12月は30分子がオゾン処理水中のBOM分子として推定された。これらの中で、両月に共通した分子は7分子（ $C_6H_8O_3$ など）のみであった。生分解実験におけるピーク強度減少量上位5つの分子を対象として、実際の処理工程水中における挙動を解析すると、各月ともに1分子を除いて、オゾン処理によってピーク強度が11月では2.1–7.2倍、12月では2.3–6.8倍に増加しており、これらはオゾン酸化によって生成していると考えられた。その後、BACろ過によってオゾン処理前と同程度までこれらの分子のピーク強度は減少しており、確かにBACろ過において除去されていることが推察された。

久能 樹^{1,2}, 松本 修治^{1,2}, 久能 均^{1,2}, 高田 潤^{1,2}¹岡山大学大学院自然科学研究科, ²JST-CREST

鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属は、湧水池や緩やかな流れの小川で黄褐色のバイオフィルムを形成する。*Leptothrix* 細胞は表面から無数の有機ナノ繊維を分泌しつつ連鎖状に分裂して縦列の細胞鎖を形成する。このナノ繊維は相互に癒着し、網目状に織り込まれて、細胞鎖を取り巻く鞘構造原基を形成する。この段階では、鞘構造は有機質主体であるが、水圏環境中のFe、P、Si等の無機物を吸着して無機・有機物からなる成熟鞘となる（直径約1 μm ）。分泌ナノ繊維は、多糖、タンパク質、脂質、核酸から成り、これらに含まれる官能基が無機物沈着に関与すると考えられている。水圏中の自動酸化により形成されたFe(III)粒子がアミノ基を介してナノ繊維に沈着するという我々の提唱した新たな鉄沈着機構から推定すると、ナノ繊維はFe以外の多種多様な金属・非金属イオンを吸着する潜在能力をもつと考えられた。そこで本研究で、稀少金属を含む47種類の金属・非金属塩の水溶液を用い、ナノ繊維に吸着するイオンのスクリーニングを行った。その結果、ナノ繊維は供試したすべてのイオンに吸着性を示したが、特にTi、Y、Zr、Ru、Ag、Au等の遷移金属イオンに対して高い吸着能を示すことを見出した。Cu、Pt、Ag、Au 吸着後のナノ繊維を電子顕微鏡、X線回折、フーリエ変換赤外分光分析で精査した結果、i) 5-10 nm径のナノ繊維が凝集して鞘原基の基本骨格を構成している、ii) Cu、Pt、Agはナノ繊維全体に沈着している、iii) Cu、Pt、Agを吸着したナノ繊維の基質はアモルファスである、iv) Cu、Pt、Agはナノ繊維の水酸基を介して吸着する、v) ナノ繊維に吸着したAuは、10-100 nm径の金属ナノ粒子として存在すること等が明らかになった。これらの結果から、*Leptothrix* が分泌するナノ繊維は、水圏環境中の稀少金属等の吸着・回収素材として利用できると考えている。

高橋 迪子¹, 今村 みなみ¹, 岡倉 優美子¹, 大島 千尋¹, 万木 理恵², 高橋 肇¹, 久田 孝¹, 木村 凡¹, 小関 正道²¹東京海洋大・食微, ²東京家政大・家政

緩速ろ過法とは、ろ過槽に充填した石砂および砂層表面に形成した生物膜を用いた水の浄化法である。本浄化法は薬剤を使用せずに原水中の濁りや細菌、原虫等を除去できることが経験的に知られているが、そのメカニズムや砂層表面の生物膜における生物群集の構成はいまだ明らかになっていない。また、食水系感染症の原因となる各種病原菌やウイルスに対する除去効果も十分に検討されていない。本研究では、緩速ろ過装置を試験的に作製し、食中毒菌およびウイルスの除去効果を検討した。あわせて、次世代シーケンサーを用いて緩速ろ過装置内の生物膜フローラを解析した。はじめに、高さ70 cm 内径18 cmの円柱に粒径の異なる砂利やろ過砂を充填し、緩速ろ過装置を作製した。これに神奈川県内で採水した河川水を流速4.2 L/hで2ヵ月間循環させ、砂層表面に生物膜を形成させた。作製した緩速ろ過装置に*Listeria monocytogenes*、*Salmonella* Typhimurium、*Escherichia coli*、Murine norovirus strain 1 (MNV-1)を接種した汚染水を通水させ、これら病原体の除去効果を評価した。その結果、生物膜が形成された緩速ろ過装置ではいずれの菌種およびウイルスも3.2 log CFU/mL以上低減し、そのうち*E. coli*と*S. Typhimurium*では4.0 log CFU/mL以上の低減が認められた。病原体除去効果を示したろ過装置の表層から生物膜を採取し、18S rDNAをターゲットに次世代シーケンサーを用いてフローラ解析を行ったところ、OcrophytaとCerczoaが生物相全体の70%を優占していた。これら生物膜を構成する生物群は、いずれも一般的な環境中に広く分布する生物によって構成されていることが明らかになった。本研究により、緩速ろ過が主要食中毒菌やウイルスの除去を可能にすることが実証された。さらに、次世代シーケンサーを用いた生物膜の包括的解析によって生物膜が一般的環境に分布する生物から構成されていることが初めて明らかになり、珪藻やアメーバの捕食作用などによって食中毒菌やウイルスが除去されていることが示唆された。緩速ろ過法はシンプルな構造とランニングコストの低さから、食水系感染症が危惧される環境水の二次処理等に導入することで、公衆衛生向上に寄与できるものと期待された。今後は、緩速ろ過の幅広い利用に向けて、ろ過能を持つ生物膜のさらなる解析とその再現性などの検討が望まれる。

近藤 美咲¹, 中川 克彦², 牛尾 一利², 早瀬 伸樹²¹新居浜高専・専攻科, ²新居浜高専・生物応化

【目的】合成染料の約半分を占めるアゾ染料の脱色により生じる芳香族アミン化合物は、難分解性で、環境や人体に悪影響を及ぼす原因の一つであり、環境保全のためにも芳香族アミン化合物をさらに分解し、無毒化する必要がある。本研究では、アゾ染料のオレンジII等が分解することによって生じる芳香族アミン化合物であるスルファニル酸をモデルとしてその微生物分解について解明を進めている。これまでの研究において土壌から得たスルファニル酸集積培養液からスルファニル酸分解に関与している624-S株と624-L株の単離に成功した。本研究では、これら2株の共生によるスルファニル酸分解機構について検討を行った結果を報告する。【方法と結果】スルファニル酸を単一炭素源とした液体培地へ624-L株、624-S株をそれぞれ別々に、また両菌株を混合して植菌し、30℃で振とう培養を行った。その結果、624-S株の単独培養においては増殖が観察され、スルファニル酸が約60%分解されたが、624-L株の単独培養では増殖は観察されず、スルファニル酸は分解されなかった。一方、両菌株の混合培養では、顕著な増殖が観察され、スルファニル酸はほぼ完全に分解された。以上の結果から、624-S株がスルファニル酸を分解する能力、624-L株は624-S株に対する増殖促進効果を有していることが明らかになり、両菌株が共生することによってスルファニル酸の速やかな分解が可能になっていると推測された。そこで、まず624-L株が624-S株の増殖を促進する栄養素を生成している可能性を検討するため、酵母エキスを添加してスルファニル酸分解試験を行った。その結果、菌体増殖とスルファニル酸分解速度は酵母エキスの存在によって促進されたが、最終的なスルファニル酸分解量は酵母エキスを加えていないものと同じになった。次に、スルファニル酸分解にともない、増殖阻害性の亜硫酸イオンが蓄積している可能性が考えられたことより、各培養液の亜硫酸イオン濃度を測定した。その結果、624-S株の単独培養においてはスルファニル酸分解に伴っての亜硫酸イオンの蓄積が確認された。一方、両菌株の混合培養では、亜硫酸イオンの蓄積は見られなかった。以上の結果から624-L株のスルファニル酸分解促進効果は亜硫酸イオンを除去することにより624-S株の増殖阻害を防止していると考えられた。現在は亜硫酸の除去による624-S株のスルファニル酸分解促進について更なる検討を行っている。

田上 晃二, 砂入 道夫, 岩淵 範之
日大・生資科・応生科

【目的】 *R. erythropolis* PR4 株は、難揮発性有機溶媒に優れた耐性を有し、かつ、細胞がアルカン相に移行して生育できる炭化水素分解菌である。それ故、PR4株が有するアルカン相内で生育できるという性質は、bioavailabilityの低さが問題となり、その処理が難航している高疎水性の有機化合物の分解、浄化に有用であると考えられ、微生物製剤への応用が期待されている。一方で、超音波による水/有機溶媒の二相液の乳化は、乳化剤を使わないことから、環境負荷の少ない乳化技術として期待されている。それ故、我々は、PR4株が有機相に存在する二相液を超音波処理することで、細胞入りのミセル液が出来るのではないかと考えた。本研究では、将来的な微生物製剤の開発を念頭に置いて、PR4株がアルカン相に移行した二相培養液を超音波処理によりミセル化液を作製し、その石油分解への有効性を検討した。【方法、結果と考察】IB2液体培地に各種アルカンを添加した二相培養系でPR4株を培養し、細胞をアルカン相に移行させた。この培養液を超音波処理器により乳化処理を行い、ミセル粒径、平均細胞数、細胞の生理状態、weathered crude oil (W-oil)の分解性を検討した。その結果、IB2培地にヘキサデカン(C16)を10%(v/v)で添加した条件において、平均粒径が $12.5 \mu\text{m}$ のC16中に平均細胞数が4.2 cells/particleで存在する含微生物ミセル液を作製した。CTC染色により、これらの細胞の呼吸活性を検討したところ、超音波処理により呼吸活性は失われないことが示された。また、その生菌数を検討したところ、超音波処理の前後で結果が変わらなかったことから、超音波処理は、PR4株の生育に影響を及ぼさないと考えられた。続いて、サンプルのW-oilの分解性を検討したところ、ミセル化された菌体を投入した条件は、他の条件に比べ、序盤の分解率が高かった。以上のことから、超音波処理により得られた含微生物細胞アルカンミセル液は、微生物製剤の製造法として有用である可能性が示された(特願2016-97159)。

鬼澤 里奈¹, 豊福 雅典², 森永 花菜¹, 尾花 望², 野村 暢彦²¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を産生することが知られている。MVとは直径20~400 nmのナノ粒子であり、細胞膜によって形成される。MVにはタンパク質や脂質、DNA、シグナル物質など細菌由来成分が多数含まれることが知られており、遺伝子の水平伝播や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いる。このことから、MVは細胞間相互作用において重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに報告されたMV研究の多くは単離株を用いた限られた条件下のものである。その一方で、海水中にMVが豊富に存在するなど (Biller, et al., 2014)、実環境中にも多くのMVが存在し、微生物生態に深く関与している可能性がある。しかし、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く存在する。そこで、本研究では実環境中におけるMV生産とその機能を明らかにすることを目的とした。本研究では微生物が多く存在することが知られている活性汚泥を用いた。まず、超遠心によって回収した粒子画分の膜脂質を細胞膜染色剤FM4-64によって定量し、電子顕微鏡 (TEM) を用いて微細構造を観察した。その結果、MV様粒子が同定され、活性汚泥中にMVが存在することが示唆された。次に、次世代シーケンサーを用いてMV供与菌の探索を行った。活性汚泥および粒子画分からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子に基づく次世代シーケンス解析の結果、門レベルで活性汚泥と粒子画分の細菌叢に違いが見られた。Proteobacteriaの16S rRNAは活性汚泥と粒子画分の双方で検出されたのに対し、Nitrospiraeは活性汚泥のみで検出された。また、先行研究においてMV生産が報告されているParacoccus属細菌の16S rRNAが粒子画分にて検出されたことから、活性汚泥中でParacoccus属細菌がMVを産生している可能性が高いと考えられる。本研究により、実環境中のMV供与菌を同定し得る手法を見出した。さらに、他環境下におけるMV供与菌も探索していく。今後、実環境中におけるMV供与菌と受容菌の関係を明らかにしていくことにより、複合微生物系の理解へと繋がることが期待される。

田代 幸寛, 砂掛 愛, Kathrina Mae Bienes, 浅田 実, 酒井 謙二
九大院・生資環

【背景・目的】当研究室では、鹿児島市における廃水処理過程（活性汚泥法および超高温堆肥化法）を対象とした微生物研究を遂行している（Tashiro et al., JBB, 2016）。先行研究では、超高温堆肥化への関与が示唆される好熱菌を常温で処理された原料汚泥（消化汚泥）からも分離しており、その分布や由来は大変興味深い。さらに、市内に降灰堆積した火山灰中からも遺伝子レベルで高度好熱菌を検出しており、消化汚泥、堆肥および火山灰間における高度好熱菌の関係性が示唆された（Bienes et al., in submission）。そこで本研究では、桜島火山灰中から高度好熱菌の分離を試み、消化汚泥、堆肥より分離された高度好熱菌との比較を行うことにより、火山灰および廃水処理過程の関係を明らかにすることを目的とした。【方法】異なる時期・地点より採取された桜島火山灰6種（A-F）、鹿児島市水道局より供与された消化汚泥および堆肥を試料として用いた。各試料を種菌として75°Cで48 h培養し、高度好熱菌を集積するとともに、変性剤濃度勾配ゲル（DGGE）法により細菌群集構造を解析した。さらに、集積培養液より、高度好熱菌を75°Cで分離・純化し、16S rRNA遺伝子解析により同定した。【結果・考察】集積培養液のDGGE解析の結果、高度好熱菌である *Thermaerobacter composti*（消化汚泥、堆肥、火山灰C）、*T. marianensis*（堆肥、消化汚泥、火山灰BおよびD）、*Calditerricola satsumensis*（堆肥、消化汚泥、火山灰BおよびC）のバンドが検出された。さらに、火山灰C-Fから高GC含量の細菌のバンドが検出されたため、さらなる高度好熱菌の存在が示唆された。さらに、堆肥、消化汚泥および火山灰から *T. composti* 類縁菌、火山灰から *T. marianensis* 類縁菌、堆肥および火山灰から *C. satsumensis* 類縁菌の分離に成功した。以上の結果、火山灰には高度好熱菌が存在し、一部は火山灰を媒介として、廃水処理過程の試料に拡散し生存していることが示唆された。

竹中 亮太¹, 金田一 智規¹, 大橋 晶良¹, 尾崎 則篤¹, 青井 議輝²¹広島大・大学院工学研究科, ²広島大・大学院先端物質科学研究科

Candidatus Saccharibacteria (TM7) は代表的な未分類細菌門の1つで、多くの研究がされてきた。しかしTM7に特異性を有するPCRプライマーとFISHプローブの特異性を疑問視する報告がされた。未培養細菌群の集積培養系からの分離培養においては、確実に増殖していることをモニタリングすることが重要であり、特異性の高いPCRプライマーやFISHプローブを使用することが不可欠である。そこで本研究では、既報のTM7プライマーのうち、特異性が高いPCRプライマーを選定し、定量PCR法で用いることで、環境中のTM7のみを確実に定量する手法の確立を目指した。東広島市の下水処理場の活性汚泥を採取し、DNA抽出を行った後TM7に特異性を有するプライマーを用いてPCRを行った。使用したプライマーは過去の論文とARBプログラムの検出割合を参考に4種類選定した(314F,580F,910R,1177R)。また、アニーリング温度勾配をつけPCRすることで最適アニーリング温度の決定を行った。次に4つのプライマーセットを用いて4つのクローンライブラリーを作成した。解析できたクローンを97%以上の相同性に基づきOTU分類し、活性汚泥から得られたTM7のOTUの系統樹を作成した。最後に4種類のプライマーセットをそれぞれ用いて定量PCRを行った。定量の際にサンプルは2つ用意した。1つ目は活性汚泥抽出液のみ、2つ目は活性汚泥抽出液と各プライマーに2~4のミスマッチを持つ*Hydrogenophaga* sp.のプラスミド回収液と活性汚泥抽出液との混合液とした。定量PCRの結果、定量値はそれぞれサンプル1と2でほぼ同じ値になったが、314F-910Rと314F-1177Rのメルトカーブはサンプルとスタンダードのピークが一致しなかった。このことから非特異的増幅が起きた可能性がある。580F-910Rと580F-1177Rのメルトカーブはサンプルとスタンダードのピークが一致した。580F-910Rが最もサンプルとスタンダードのグラフが近似した。以上の結果から、特異性・増幅長さ・メルトカーブでの形状を考慮すると580F-910Rのプライマーセットが定量PCRを行う上で最も適していると考えられる。

野町 真名実¹, 藤谷 拓嗣¹, 長谷部 吉昭², 江口 正浩², 常田 聡¹¹早大院・生医, ²オルガノ株式会社

【背景】硝化菌は、有毒なアンモニアを亜硝酸、硝酸へと酸化する。従来、硝化反応はアンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化微生物と亜硝酸を硝酸に酸化する亜硝酸酸化細菌による二段階の反応であると考えられていた。しかし近年、亜硝酸酸化細菌の一種である*Nitrospira*の中にアンモニア酸化能を持つ、完全アンモニア酸化（Complete ammonia oxidation: Comammox）細菌の存在が明らかとなった。その後、Comammox細菌が様々な環境中の硝化反応に寄与していることが示唆され、排水処理プロセスの安定化においても重要視されている。しかしながら、Comammox細菌は純粋培養されていないため、詳細な性状は明らかになっていない。そこで本研究では、硝化菌を標的とした分離培養技術を利用し、Comammox細菌の獲得を目指す。

【方法】サンプル源として産業廃水の窒素除去を担うグラニュールを使用した。まず、1) アンモニア含有無機基質を連続的に供給した集積培養槽内でComammox細菌の高度集積化を行った。つづいて、2) セルソーターを使用し、集積サンプル中に存在している硝化菌のマイクロコロニー（10-100細胞）の大きさと凝集構造の違いを散乱光で検出することで、マイクロコロニーだけを生きたまま特異的に分取した。その際、超音波処理時間とソーティングエリアを変化させ、Comammox細菌の分取において最適な条件を検討した。その後、96ウェルプレートにマイクロコロニーを一つずつ分注し、アンモニア含有無機培地で液体培養を行った。

【結果および考察】低濃度のアンモニア含有無機培地を連続的に供給することで、系統的に異なる数種類の*Nitrospira*を集積化した。その中には、*Nitrospira*であるにも関わらず亜硝酸流入による培養で消失する系統グループが存在した。この系統グループはアンモニア酸化によってエネルギーを得るComammox細菌である可能性が示唆され、その存在率は36%まで上昇した。さらに、FISHプローブを作成して形態を観察した結果、Comammox細菌がマイクロコロニーを形成していることが確認された。そこで、Comammox細菌の分取に最適な条件を決定し、マイクロコロニーの分取、純粋培養を行った。

【展望】純粋培養が確認されたComammox細菌の株を用いて、生理学的な性質とゲノム特性を明らかにしていく。また、本手法を他の環境サンプルに応用することで、様々な環境からComammox細菌を獲得できることを実証する。

末永 俊和¹, 坂本 望¹, 中川 洋祐¹, 堀 知行², 利谷 翔平¹, 細見 正明¹, 寺田 昭彦¹¹農工大・工, ²産総研

亜酸化窒素(N₂O)は21世紀最大のオゾン層破壊物質および強力な温室効果ガスとして知られており、放出の抑制・削減が求められている。本研究ではN₂OをN₂へと無害化するN₂O還元細菌に焦点を当て、N₂O放出抑制技術への利用可能性に関して検討した。排水処理施設に生息するN₂O還元細菌の獲得を目的とし、中空糸ガス透過膜内にN₂Oを電子受容体として供給できる集積培養装置で連続培養を行った。結果、Rhodocyclaceae科の優占化が確認され、Azospira属とDechloromonas属を単離することに成功した。N₂O還元に関わる機能遺伝子(nosZ)の解析で、これらの単離株は近年新たに報告されたnosZ clade II typeに分類されることが分かった。これらの単離菌株の動力学的活性を明らかにするため、微小電極を用いたマイクロレスピレーションシステムを応用し、N₂Oの還元活性を評価した。その結果、今回得られた単離菌株はN₂Oへの親和性が既往の脱窒細菌と比較して1.5-4.7倍高いことが明らかになった。また、酸素がN₂O還元活性に及ぼす影響を、同システムを用いてAzospira sp.と既往の脱窒細菌であるPseudomonas stutzeri, Paracoccus denitrificansで比較した。既往の脱窒細菌では酸素が20 μM以下まで消費されるまでN₂O還元活性がみられないのに対し、Azospira sp.の一部の株においては、100 μM程度酸素が存在する微好気環境下でもN₂O還元活性が発現する可能性が示された。さらに、P. stutzeriはN₂O還元反応が十分発現するのに無酸素状態になってから5時間以上要するのに対し、Azospira sp.は1.5時間以内と非常に短時間でN₂O還元反応に切り替わる性質が確認された。N₂O還元活性は酸素阻害で容易に失活すると報告されているが、その影響の度合は株レベルで異なること、無酸素状態になった後のN₂O還元活性の発現し易さも細菌種で異なることが示唆された。N₂O還元細菌のN₂O放出抑制技術への利用に向けた基礎的な知見として、Azospira sp.の高いN₂O還元能力と、酸素の存在に対する耐性を明らかにした。これらの知見を元に、今後ラボスケールの活性汚泥システムを用いて、N₂O削減効果の検証実験を行う予定である。

山田 剛史¹, 原田 淳¹, 岡崎 祐輝², 浜田 雅子¹, 山口 剛士², 中野 淳³¹豊橋技科大・院工・環境・生命, ²松江高専・環境・建設工, ³住友重機械エンバイロメント

高負荷・高速運転が可能なExpanded granular sludge bed (EGSB) リアクターの普及や適用廃水種の拡大に伴い、未だ認知されていない問題が確認されてきている。とくに深刻な問題は、ある種の糸状性微生物の異常増殖によるグラニュール汚泥が突発的な浮上・流出する問題 (嫌気性バルキング) である。しかしながら、発生メカニズムはおろか原因菌すら不明であり、即効性の高い対策が立てられないのが現状である。我々は、食品系有機性廃水を処理する実規模EGSBリアクター2基 (EGSB-AおよびEGSB-B) の立ち上げ期間において、嫌気性バルキング現象を確認した。嫌気性バルキングの制御法を確立するには、バルキング原因菌の同定やその微生物機能情報の解明が必要不可欠である。そこで本研究では、まず、両リアクターの嫌気性バルキングの原因菌を明らかにすることを目的とした。本研究では、バルキング汚泥と採取時期が異なる健全な汚泥から抽出したDNAをもとに、16S rRNA遺伝子アンプリコン解析を行った。その結果、両リアクターともバルキング発生時には、健全な汚泥と比べて複数種の微生物群の割合が増加することが判明した。具体的には、EGSB-Aの汚泥では、バクテロイデス門やクロロフレキシ門に属する未培養微生物が増加するのに対して、EGSB-Bの汚泥では、プロテオバクテリア門やユリアーキア門に属する未培養微生物が増加していた。次に、当該未培養微生物由来のほぼ全長の16S rRNA遺伝子配列を得るため、バルキング汚泥から抽出したDNAを用いた16S rRNA遺伝子クローニング解析を行った。得られた16S rRNA遺伝子配列をもとに作製したバクテロイデス門の未培養微生物に特異的なDNAプローブを用いたin situ DNA-hybridization chain reaction解析では、EGSB-Aリアクターのバルキング汚泥内において蛍光染色された微生物は、糸状性の形態を示すことを明らかにした。さらに、EGSB-Bのバルキング汚泥内微生物に対するfluorescence in situ hybridization解析では、未培養糸状性微生物はユリアーキア門アーキアであることが判明した。本結果は、これらの糸状性微生物が両リアクターのそれぞれのバルキングに関与する可能性を示唆している。

平片 悠河¹, 幡本 将史¹, 山口 隆司¹, 押木 守², 荒木 信夫²¹長岡技大・院, ²長岡高専

【目的】都市下水を処理するUASB槽内には真正細菌、古細菌のみならず、原生動物も生息している。好気性処理法における原生動物は、処理水質の変化に関連して優占する種が知られており、指標生物として利用されている。一方で、嫌気性処理における原生動物の知見は少なく、特にUASB槽内の原生動物種の多くは未培養であり、その生理学的特性も不明である。そこで本研究では、UASB槽内に存在する原生動物群集の解析と、詳細な生理学的特性を明らかにするために原生動物の分離培養を試みた。【方法】汚泥サンプルは、都市下水を通水するUASB槽 (容量1148 L、外気温10-28℃)より、2010年10月から2012年10月までの2年間に10回採取し、原生動物を含めた真核生物が共通して保有する18S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコン解析を行った。原生動物の培養には無機塩培地を使用し、餌菌としてBacteroides graminisolvensを添加した。また、補助基質として脂肪酸(オレイン酸 10 mg/L及びステアリン酸 10mg/L)、脂質(エルゴステロール 1mg/L及びスティグマステロール 1mg/L)を添加し、室温で嫌氣的に培養を行った。【結果】18S rRNA遺伝子解析の結果、UASB槽内からは細菌捕食性の原生動物である繊毛虫類のCiliophora門及びアメーバ類のAmoebozoa門が優占して検出された。さらに、鞭毛虫類のCercozoa門、Apusozoa門、Metamonada門、Bikosea綱も検出された。Apicomplexa門、Perkinsea門、Dinoflagellata門、Ichtyosporea綱などの寄生性として知られる種も高頻度に検出されたが、下水に存在した種がUASB槽内に流入したものと考えられた。また、培養実験の結果、補助基質として脂質を添加した系ではMetamonada門に属するTrichomitus batrachomrumに近縁(相同性93%)な鞭毛虫類が、脂肪酸を添加した系ではCiliophora門に属するCyclidium porcatumに近縁(相同性96%)な繊毛虫類が増殖した。どちらの種も年間を通して検出されており、本実験よりUASB槽内に生息している原生動物種の集積培養に成功した。

小川 人土¹, 井上 千弘²¹玉川大学 学術研究所, ²東北大学 大学院 環境科学研究科

強病原性インフルエンザ等の家畜感染は養豚や養鶏の現場では経営的に悲劇になるばかりでは無く、感染予防の観点から非感染動物を含めて地域全体の数万単位での殺処分が行われている。酪農先進国で有り日本へのハム肉としての豚肉輸出を国家の基幹産業としているデンマークでは外界の野生動物との接触を避けるために閉鎖型（シールド型）養豚を行っているが、換気は内部の動物からの放熱と排泄物の臭気を伴い凄まじい濃度の悪臭を含んでいる。さらに湿度はほぼ100%の状態であるため排気は重く地表面や風下数十キロ離れた場所で悪臭公害を引き起こしている。養豚農家の換気の風量は小さな家族経営レベルでも1時間1万立方メートルを超える量であり、物理化学的脱臭装置では経済負担が大きく無しえない。そのため生物学的処理法を応用しアンモニア臭気を効率的に捕集し処理する事を計画し、養豚舎からの排気中の臭気成分の中で一番量の多いアンモニアの生物学的分解と処理水の利用による捕集の効率化と余剰窒素成分の除去を試みた。

崎山 弥生, 荒川 貴行, 鎌田 幸, 藤田 克利, 清田 純也, 中川 恭好, 鶴海 泰久, 木井 保夫
独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター・NBRC

NBRCカルチャーコレクションは、微生物を中心とした生物遺伝資源の収集、保存、提供を行うとともに、その利用基盤を整備し、生物遺伝資源の研究、教育、産業への利用促進を図っている。NBRCが提供する微生物のコレクションは2つあり、1つは公定試験法に指定された株や論文発表などのために国内外の研究者から寄託された株などを中心とするパブリックコレクションの「NBRC株」、もう1つは産業のためのスクリーニング源として利用されることを想定し国内外の多種多様な環境からNBRC自らが分離、収集した株であるプライベートコレクションの「RD株」である。2017年3月末時点において、両コレクション併せて約91,000株の微生物（細菌・放線菌・アーキア・糸状菌・酵母・微細藻類・バクテリオファージ）を保有しており、外部からの寄託やNBRC自らが分離することにより毎年1,500株程度を収集している。さらに、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の『完全長cDNA構造解析プロジェクト』、『タンパク質機能解析・活用プロジェクト：スプライシング・バリエラントの取得技術の開発』、『糖鎖プロジェクト』にて取得された約99,000個のヒト関連クローンや微生物DNAクローン、難培養のNBRC株やゲノム解析されたNBRC株などから抽出したゲノムDNAを分譲している。これまでNBRCが受け付けていた生物遺伝資源（微生物・DNAリソース）の寄託には、NBRCからその生物遺伝資源を入手した利用者の利用目的を制限しない「一般寄託」と、利用目的を研究に限定し商業利用時は寄託者の事前許可が必要な「制限付き寄託」の2種類があったが、寄託者の目的に適した利用条件を指定できるように寄託の内容を見直した。具体的には、寄託した株の利用条件を、① 利用目的の制限無し、② 商業的利用する場合は寄託者との協議が必要、③ 非商業的利用に限定、④ ①～③以外の利用条件を寄託者が指定（ただし、寄託者又は寄託者が指定する第三者の許可がないとNBRCは寄託された資源を分譲できない、寄託者がNBRCから利益の配分を受けるという条件は認めない。）の4つから、寄託者が寄託時に選択するようにした。

森 史¹, 湯本 康盛¹, 石本 美和¹, ノエル マリーエレン², 佐藤 真由美², 山口 晴代², 河地 正伸²

¹(一財)地球・人間環境フォーラム, ²国立研究開発法人 国立環境研究所

国立環境研究所 微生物系統保存施設 (NIES コレクション) は、環境研究の推進に必要な藻類保存株の収集・保存・提供を目的として1983年に開設された。2002年以降は文科省NBRPにおける藻類リソースの中核機関として、ライフサイエンスに重要なモデル生物や応用利用に有用な保存株の収集とその付加情報整備にも取り組んでいる。現在では、様々な研究目的で利用される多様な藻類および藻類に系統的に近縁な微生物株が保存されており、全株数は2017年4月現在で3,767株、そのうち811種、2,682株を公開している。2016年度の方譲数は、425件で国内1,330株、国外225株、合計1,555株である。前年度より約1.5倍に増え、コレクション開設以来、最高の方譲数となった。研究機関からの依頼が多いが、近年海外企業からの依頼株数が増加傾向にある。新規寄託株は、新種記載種5株、ゲノム解読株5株を含む157株で、3年連続で150株以上の寄託を受けている。長期保存に関しては、新たに214株の凍結保存への移行と凍結タイプ標本4株の永久保存を進めるとともに、細胞ステージが変化しやすい円石藻や生存率の低いクラミドモナス株の凍結保存条件を検討した。またセルソーターによる細胞分離と抗生物質処理により、4株の新たな無菌株を確立した。藻類コレクションの利用拡大に向けた新たな活動として、1) 年3回のメールニュースの配信、2) 初心者ユーザー向けの藻類培養トレーニングコースの開催、3) 植え継ぎ手順等の技術動画や藻類・プロテオームのYouTube公開、4) ホームページの新デザインへの改訂等を行った。保存株の付加情報の整備としては、40株の保存株のDNAバーコード情報整備に取り組むとともに、研究所内外のプロジェクト等において、NIES-88 *Microcystis aeruginosa*, NIES-981 *Cyanobium* sp., NIES-2152 *Parachlorella kessleri*の他、12株で新たに全ゲノムやオルガネラゲノムの解読が行われた。解析結果の公開を受けて、保存株情報から公的データベースへのリンクも整備した。更にNBRPゲノム情報等整備プログラムに採択され、豊橋技術科学大、国立遺伝研と共同で『NIESコレクションのシアノバクテリアのゲノム情報整備』を実施している。

青木 孝之, 澤田 宏之, 永井 利郎, 一木 植原 珠樹, 埋橋 志穂美, 竹谷 勝, 山崎 福容, 中島 比呂美,
熊谷 みどり, 大橋 美保, 佐藤 豊三, 根本 博
農研機構・遺伝資源

農業生物資源ジーンバンク事業は2015年度までは（国研）農業生物資源研究所（生物研）の事業として運営されてきたが、農業研究法人の統合により、2016年度からは（国研）農業・食品産業技術総合研究機構の実施する事業として新たに位置づけられた。同事業はこれまでの実績を継承しつつ、新たな組織体制の下でのセンターバンク・サブバンク体制にて推進されることとなった。【収集保存・特性評価】農業や食品産業等に係る807株の微生物を新規登録し、2017年3月31日の時点で、保存株数は33,302株（公開率：80.4%）である。また、保存株の分類学的性状、病原性、物質生産性を始めとする延べ1,636点の特性情報を集積し、植物病原糸状菌や酵母のrDNA ITS 領域や植物病原細菌の16S rDNA 等、計1,508点のDNA塩基配列の整備を行った。植物ウイルスについては外被タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列情報を登録ウイルス17株について新たに解析するとともに、309株について公開した。整備した塩基配列情報を基にジーンバンク登録株の分類検証を行い、再同定と分類変遷の結果として258菌株、また、2012年に行われた命名規約改正による学名統合への対応として887菌株の、合計で1,145菌株の見出し学名を変更した。一方、微生物遺伝資源の特性評価課題として「ジーンバンク所蔵のキウイフルーツかいよう病菌 biovar 6系統の比較ゲノム解析（果樹茶業研究部門）」を実施し、また、難保存性の微生物遺伝資源の長期安定保存のため「農業生物資源ジーンバンク事業が保存する卵菌類等遺伝資源の安定的長期保存法の開発（遺伝資源センター）」の課題を実施した。【ユーザーへの提供】2016年度は国内外へ1,370株（申込330件）を配布し、病害診断・病原検出、農業開発、分類同定等に係わる試験研究・教育に利用された。また、「日本植物病名データベース」の更新を行った。また、前期中期計画における各サブバンクの活動を代表する研究課題として15課題を選出し、取りまとめた原稿を微生物遺伝資源探索収集調査報告書第25巻として刊行し、当ジーンバンクのウェブサイトにもPDF版を掲載した（http://www.gene.affrc.go.jp/?pub#parent_me25）。

田中 尚人^{1, 2}, 宮崎 智³¹東農大・菌株(NRIC), ²東農大・生命科学・分子微生物, ³東京理科大・薬・生命創薬

【目的】カルチャーコレクションには有用な微生物株が数多くある。カルチャーコレクションはこれらを管理、保存し、ユーザーに提供する。多くのユーザーはカルチャーコレクションを自身の研究の比較対象株を提供する機関と認識しているが、産業利用にもつなげられるような有用株を提供する機関となるポテンシャルはある。ただ、何の情報も無く利用につなげることはできるはずもなく、また、微生物の利用目的は種の多様と同じように多種多様で、全ての株に全ての求められる機能を見いだすのは難しい。しかし、系統群毎に求められる機能に特徴がみられることもある。そこで、NRIC では乳酸菌株をモデルケースとして、菌株の性状をデータベース化し、ユーザーが菌株に有用性を見だし、利用につなげられるようなシステムを構築したので紹介する。【データベース】乳酸菌の性状データは発酵生産に関連するデータと機能性に関連するデータの2つのタイプからなる。前者はいわゆる生育環境への適応能で、温度試験やpH 試験、糖類発酵能試験等のデータであり、どのような原料をどのような条件で発酵できるかの指標となる。後者は例えば多糖や γ -アミノ酪酸等の物質生産能、免疫誘導能、バクテリオシン生産能等で、発酵物や菌体にどのような付加価値を付けられるかの指標になる。以上のデータ項目を全部で78件設定した。各データ項目に対する菌株の値は、優劣や強弱を+または数値で表現した。【検索システム】データベースから目的の菌株を検索するシステムには「完全一致検索のシステム」と「最適菌株検索システム」を開発した。数値データはシステム側で+に変換し、前者の検索システムではユーザーがデータ項目とそのデータ(+/-)を設定し、完全にマッチした菌株だけ抽出する。しかし、ユーザーが複数のデータ項目を指定した場合は、完全一致する菌株が存在しない可能性がある。そこで、指定されたデータに最も近い菌株を検索するよう開発したのが後者のシステムである。これら2つの検索システムにより、ユーザーが菌株の有用性を効率的に見いだすことができる。本システムをモデルケースとして、環境微生物についても物質生産能や分解能、宿主との相性等といった性状の検索システム提供も可能と考えられる。<http://www.ps.noda.tus.ac.jp/labdb/jsps/index.jsp>

早乙女 梢, 前川 二郎, 遠藤 直樹, 中桐 昭
鳥取大・農

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター（FMRC）では、担子菌類や子囊菌類の中でも大型の子実体を形成し、「きのこ」と呼ばれる菌群に着目し、それらの利活用の推進を目的に基礎および応用研究と教育活動を実施している。その一方で、当センターは菌株保存機関として、主にきのこ類の菌株を収集・保存するとともに、保有菌株（TUFC株）の一部を公開し、それらの詳細をオンライン上のデータベースで公開しながら、分譲提供サービスにも取り組んでいる。2016年度は、分離菌株の確立や維持が困難な菌種が多いことから、TUFCコレクションにおいても保有菌株数が限られていた菌根菌類を中心に菌株収集を進め、結果、82属127種178株を新規登録し、総計菌株保有数は521属1,499種8559株となった。また、分離源証拠標本の再検討や菌株の分子情報に基づくTUFC株の評価も進め、2017年4月までの分譲可能株数は総計297属614種1,335株となった。民間企業を含む学内外への保存菌株提供数は計21件89株であった。FMRCの菌株保存機関としての機能充実に注力し、菌株寄託制度を整備したほか、農林水産省より指定微生物保存機関としての認可を取得し、輸入有害菌の受入れや外部分譲が可能となった。また、分譲菌株数の増加を目指して、公開菌株情報を掲載した「鳥取大学 TUFC 菌株カタログ」（冊子体）を2017年3月に発行した。遺伝資源としての「きのこ」の教育・普及活動を目的とした社会貢献事業としては、鳥取県内の博物館にて一般向け公開科学セミナー（10月）を開催し、野外観察や顕微鏡実習を含むきのこの観察講座（7月）も実施した。FMRCでは、マンマー・パティン大学ときのこの分類と栽培に関する共同研究を開始した。9月に現地で菌株収集を実施し、MTAに基づいて菌類遺伝資源を移転して分類研究に利用するとともに、FMRCへの教員の招聘などを通して、研究交流の促進を図った。2014年度より開始しているTUFC株の培養物由来および子実体由来の抽出物ライブラリー事業については、総計231属353種1136サンプルを作製し、創薬リード化合物や生物農薬の開発につながる有用生理活性物質の探索研究を実施した。今後は、TUFCコレクションの充実と公開を進めていく一方で、海外への菌株分譲制度やこれまでに作製した抽出物の分譲体制の整備を計画している。

宮崎 厚, 小松 仁
石巻専修大・理工・生物

ISUコレクションは、接合菌ケカビ亜門の中でもヒゲカビ(*Phycomyces*属)野生株およびその標準株からの変異株、それらの交配株を保存する稀少なコレクションである。その多くは故マックス・デルブリュック研究室（当時カリフォルニア工科大学）で作出・保存されていた菌株群である。ヒゲカビは、いわゆる“カビ”の中で特に大型の種として知られ、直径約100 μm 、高さ10cm以上にもなる直立無分枝の胞子嚢柄を形成し頂端に1つの胞子嚢を付ける（無性生殖）。胞子嚢柄は隔壁のない多核体（ケノサイト）で、光や重力等に敏感に反応して屈性を示すことから、「刺激受容—情報伝達—応答反応」のモデル生物として多くの研究に用いられてきた。また、性（+と-に区別）を持ち、一連のダイナミックな形態形成を伴う接合（有性生殖）を行うことも知られる。

宮城県石巻市南境地区の旧北上川沿いに立地している石巻専修大学は、2011・3・11東日本大震災による大きな揺れに見舞われたものの奇跡的に津波の直接波および浸水を免れた。また、4・7余震にも耐えて、実験室にある超低温槽（ -80°C ）で凍結保存されていた本コレクションの流失や破損はなかったが、ライフラインの分断により11日間に亘る電源の供給停止による庫内温度上昇の状態を余儀なくされた。この大震災による被害に際し、日本微生物資源学会の後援のもと、公益財団法人発酵研究所より支援を受けることができ、全株（届け出菌株数776株）の培養試験を実施した。

本コレクションの保存・管理および分譲事業は、兼任スタッフ1名（宮崎）で運営しているが、今回の支援により培養支援員1名を確保して培養試験を行った。今まで成長確認が行われていない胞子保存のセビージャ株（S株）およびシラキウス株（L株）も含めた全株の成長を調査した1次培養試験および成長した菌株における変異株特性を調査した2次培養試験の結果を最終報告として紹介する。

飯田 敏也, 岡田 元, 高島 昌子, 工藤 卓二, 伊藤 隆, 大和田 勉, 坂本 光央, 飯野 隆夫,
遠藤 力也, 押田 祐美, 岩城 志乃, 鈴 幸二, 大熊 盛也
理研・BRC

理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（以下JCMと略記）は、細菌、アーキア、真菌などの有用な微生物株を収集・保存し、研究者にこれらの株を提供する微生物系統保存事業を実施してきた。2007年度からは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）「一般微生物」の中核的拠点機関を担い、国内外の研究開発の動向を把握しつつ、「健康と環境の研究」に資する世界最高水準の微生物リソースを整備して、幅広い分野の研究に貢献すべく活動している。JCMでは、多くの研究者から学術研究上有用な微生物株の寄託を受けている。その数は、過去5年間の平均で910株/年となり、海外35カ国からの寄託がおおよそ7割を占めている。寄託株の受け入れ時には培養性状とrRNA遺伝子などの塩基配列を調べ、受け入れた微生物株に問題がないことを確認しているが、おおよそ11%の寄託株に不生育、汚染、参照遺伝子配列との不一致などが見られる。7名の微生物株担当者により、これらの問題が是正された高品質なリソースのみがJCMに登録され、世界の研究者に利用されている。JCMから国内外に提供される微生物株数は、過去5年間の平均で3,750株/年となり、このうち3割が海外42カ国への提供である。利用者からのニーズに応えるため、凍結乾燥などのアンプルによる提供に加え、培養微生物株やゲノムDNAでの提供も実施している。また、利用者からは多くの成果が生み出されており、2007年度からの10年間で、JCMの微生物株が利用された3,500報を超える原著論文の発表や340件を超える特許の公開がなされている。JCMの取り組みの一つに、存続が危惧される貴重な微生物資源の救済があげられる。これは、大学教職員の退職やプロジェクト研究の終了などに伴い、散逸の恐れのある学術・研究上重要な微生物株をJCMに移管していただき、後世に残す活動である。最近の事例としては、高松塚・キトラ古墳の壁画などより分離された730株余りが文化庁よりJCMに移管され、利用可能となっている。このような活動を通して、JCMは社会と研究コミュニティのニーズに沿った独自のバイオリソース事業を展開し、微生物に関連する研究の支援とその発展への貢献を目指している。

林 将太¹, 児玉 年央², 飯田 哲也², 江崎 孝行¹, 田中 香お里¹¹岐阜大学遺伝資源保存センター (GCMR), ²大阪大学微生物病研究所 (RIMD)

感染症の重要性が高まる昨今、感染症に関する教育や基礎研究の他、新しい診断薬や薬剤の研究には、標的となる質の高い病原微生物の菌株が必要である。第一期、第二期および第三期の NBRP 「病原微生物」に引き続き、第4期からは、第3期までの理念を引き継ぎ、感染症及びヒトの健康に関わる主要な微生物群である細菌部門を独立させ「病原細菌」として、感染症及びヒトの健康に関わる主要な微生物群である細菌について、コレクションのさらなる充実と利活用の推進を図る。岐阜大学・微生物遺伝資源保存センター (GCMR) (種々の領域の感染症起因菌、日和見感染菌) が中核機関となり、分担機関として大阪大学・微生物病研究所 (腸管感染症起因菌)、群馬大学・医学系研究科附属耐性菌実験施設 (バックアップの保管) との連携のもと病原菌株の収集、保存、提供を行う。臨床分離株については、運営委員会での意見を受け、第4期中には需要が高い血清型、生物型、遺伝子型、耐性株の収集を行い、遺伝子解析、品質管理情報収集を行う。亜種やタイピング情報、特徴的な性状、分離株の臨床情報等をデータベースとして整備し、研究等に使用する菌株の選択に役立つ情報として公開する。高付加価値の保存株は、感染症教育や研究に提供されるばかりでなく、今後起こりうるいかなる感染症にも対応可能なレファレンスとしての病原細菌コレクションを目指す。

杉山 峰崇, 金子 嘉信
阪大・院工・生命先端

大阪大学工学研究科の微生物保存の源は大正時代にまでさかのぼり、日本のウイスキーづくりレジェンドの一人、ニッカウヰスキー創始者の竹鶴政孝氏も学んだ大阪高等工業学校醸造科での学生実験用菌株の保存が始まりと言われている。その後、大学に昇格し、南満州鉄道（株）中央試験所の菌株も加わって本格的な保存事業になったようである。太平洋戦争を経て、新制大阪大学工学部醸酵工学科時代には日本微生物株保存連盟の一員として工業微生物株の保存体制が再整備された。そして2002年に、文部科学省のライフサイエンス研究基盤整備のためのナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）に採択され、保存事業の軸足を出芽酵母の遺伝研究株とその遺伝子クローンの収集・保存・提供に移してきた。2016年度で第3期NBRP事業が終了し、2017年度からは第4期NBRP事業に採択され、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻ゲノム機能工学研究室で収集・保存・提供事業を推進している。2016年度末での保有数は、酵母27,170、遺伝子クローン6,081となり、世界トップレベルの出芽酵母遺伝研究リソースセンターとして認知されるようになった。災害による貴重なリソースの消失を避けるため、保有菌株を広島大学自然科学研究支援開発センター（NBRP酵母分担機関）に保管するバックアップ事業も進めている。保有リソースとしては、各種野生型株やベクター、細胞周期やメンブレントラフィック、減数分裂などの遺伝学的研究に役立つ多様な遺伝子破壊・変異株、任意のタンパク質を任意のタイミングで分解することが可能なオーキシテグロンリソース、ゲノムワイドな染色体部分重複株シリーズ、タンパク質脱リン酸化酵素遺伝子の網羅的な多重欠失株セットやゲノム網羅的な遺伝子過剰発現プラスミドなどがあり、人気も高い。2016年度の提供数は、菌株と遺伝子クローンあわせて700であり、そのうち40%は海外研究者への提供であった。提供国数は23カ国にも及び、海外へのリソース提供においては安全保障輸出管理への対応も実施している。

矢口 貴志, 田中 玲子, 伊藤 純子
千葉大・真菌センター

NBRP「病原真核微生物」では、第4期より次の目標を掲げ、(1) 基準株（あるいは標準株）の充実と、(2) クラス 2, 3 の高度病原菌、(3) これまで感染例の報告のある全ての菌種、さらには、(4) 感染症の動向調査や薬剤開発のために必要となる新鮮な臨床分離株等を収集・保存・提供、また、個々の菌株においては、質的向上を図るために、(5) 重要な菌株の遺伝子配列を決定し、最新の菌学的性状、分離株の臨床情報等をデータベースとして整備、公開、今後いかなる感染症が起ってもそれに対応できる病原株コレクションを目指している。千葉大学真菌医学研究センターにおいては、これまで病原真菌・放線菌として報告された菌種を中心に標準株としての利用価値のある品揃えを目標とし、正確な臨床情報が付加された新鮮な臨床分離株を医療機関と連携して収集している。特に、近年、医真菌分野で着目されている菌種、例えば薬剤耐性を有する *Aspergillus* を重点的に収集した。病原真菌は、かつては形態による同定のみが行われており、遺伝子情報の活用は細菌より遅れていた。現在では、全菌株において特定の遺伝子および形態情報により同定を実施し、正確性が向上した。一部の菌種では、菌種特異的プライマーを設計し、迅速な同定を実施している。病原真菌・放線菌の基本的取り扱いの知識と技術を習得するために、実習を中心とした講習会を、年1回開催している。2017年度は31 回目に当たり、例年、定員を大きく超える応募があり、大変好評を得ている。また、附属病院と連携し、日本で初めて真菌外来を開設し、全国から患者が診察を受けに来ている。さらに、医師に対して、真菌症の治療に関するコンサルタントを実施している。これらにより、医療機関との連携を強化し、菌株収集に繋げている。現状、大学からはバイオリソース管理室として独立した組織で菌株の収集、分譲を実施しており、専属スタッフも配置されている。