

ヒト腸内細菌はその生命活動を通して我々の恒常性に大きく寄与している。一方で、生活習慣などの要因により腸内細菌叢が異常な状態に陥ること疾患の原因となることが報告されている。我々は、飲酒習慣による大腸がんなどの疾患に腸内細菌叢の機能変化が関わっていると考え、飲酒習慣者の極例としてアルコール依存症患者（ア症患者）と健常者の腸内細菌叢を比較研究してきた。その結果、飲酒習慣によって腸内優占種である偏性嫌気性菌が減少することが示唆された。加えて、マウスにエタノールを接種することで腸粘膜上に活性酸素種（ROS）が蓄積するという知見より、飲酒習慣は腸内細菌に対して酸化ストレスを与えていると考えた。酸化ストレスと腸内細菌の関係を調査すべく、菌叢構造解析時にア症患者で大きく減少していた*Bifidobacterium*属を腸内より分離し、酸化ストレス負荷時の酢酸、乳酸、エタノール、アセトアルデヒドの代謝変動を調査した。その結果、酸化ストレスはエタノール、酢酸、乳酸の生産能を著しく低下させることが分かった。しかしながら、アセトアルデヒドの生産能に対しては影響がみられず、株によってはその生産能を増加させることが分かった。興味深いことに、その生産量にエタノールの外部添加はほとんど影響を与えなかった。また、この時の発酵関連遺伝子の発現量は、ピルビン酸およびアセチルリン酸がアセチルCoAに流れるような代謝経路に変動を示していた。このことを、同じくヘテロ乳酸菌である*Lactobacillus*属の腸内分離株について調査したところ、*Bifidobacterium*と類似した結果を示した。*Lactobacillus*は菌叢構造解析においてア症患者と健常者間で優位な変動はみられなかった。しかし、ストレス応答時の代謝変動は顕著であることから、酸化ストレスは菌叢構造だけではなく、直接代謝物のプロファイルに影響を及ぼしている可能性がある。今後は、今回みられた遺伝子発現および代謝物の変動と飲酒習慣との相関を調査することで、飲酒習慣に起因した腸内細菌に対する酸化ストレスの実証とその影響を綿密に調査していく。

松下 一信^{1, 2}, 小田 みすず¹, 伊藤 光平¹, 松谷 峰之介¹, 松本 奈実¹, 兼崎 友⁴, 貝沼 (岡本) 章子³, 片岡 尚也^{1, 2}, 薬師 寿治^{1, 2}
¹山口大・院創科, ²山口大・中微セ, ³東農大・応生科, ⁴東農大・ゲノム

■ 概要：「実験室進化」に基づく種々のストレス耐性（耐熱性，抗生物質耐性，溶媒耐性等）獲得を目指した「適応育種」研究が，ゲノム解析技術の発展と相まって，盛んになっている。しかも，その流れはモデル微生物から発酵微生物へと拡大され，バイオテクノロジーへの利用へと広がっている。私達は，ゲノム易変異性を有する酢酸菌の特性を利用して，実験室進化に基づく適応育種，特に耐熱化育種，の研究を進めている。今回，伝統的な米酢発酵槽から単離された高酸度生成・酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株における耐熱化育種から得られたトレードオフ現象について紹介する。■ 実験と結果：NBRC3288株を酢酸発酵（3% エタノール/1% 酢酸存在）条件下，生育限界温度下で継代培養を繰り返すことによって，適応育種の途中の単離株含め3種の耐熱化株を得た。それらの耐熱性と酢酸発酵能を親株と比較したところ，耐熱化株は，発酵条件下での高温生育能と常温・高温問わずその発酵能において優れていた。一方，常温下における生育能は，発酵・非発酵（培地中に酢酸・エタノールを含まない）条件下にかかわらず，親株に比して著しく低下していた。適応変異株のゲノムリシーケンスによって，適応育種株の変異箇所を解析した結果，最終耐熱化株（ITO-3）には 8箇所の変異が見出された。これらの変異のうち，適応初期（ITO-1株）で蓄積した3つの変異遺伝子に注目して，その細胞増殖，変異遺伝子解析，トランスクリプトーム解析を行い，以下の結果を得た。1)耐熱化株では，常温の発酵・非発酵条件下において，細胞長の短縮が観察された。一方，高温下では，発酵条件下で親株に見られる著しい細胞伸張が抑制されたのに対し，非発酵条件下では，親株以上の細胞伸張を引き起こした。2)ITO-1株にみられる3つの変異のうち，少なくとも1つの遺伝子変異が，その破壊・相補実験から，耐熱化に対応していることを示唆する結果が得られた。3)非発酵条件下では，耐熱化株のタンパク質合成系の発現低下とシャペロニンの高発現，さらに発酵条件下では，それらの発現低下及び上昇がさらに強まることが明らかとなった。以上の結果をふまえ，本適応育種株のトレードオフ現象について考察する。（本研究はJST・ALCA及び東農大ゲノム解析拠点・共同研究の支援を受けて行われた。）

齋藤 淳貴¹, 橋本 和仁², 岡本 章玄³¹東京大・院応化, ²物材研, ³物材研・GREEN

微生物によるアンモニア酸化は、地球上での窒素循環や廃水処理プロセスなど、広く重要な役割を果たしている。しかし、生化学的に検証されている反応経路は、酸素を利用して亜硝酸(NO_2^-)や硝酸(NO_3^-)を生成する硝化反応[1]、及び亜硝酸を利用して窒素ガス(N_2)を生成するアナモックス反応[2]の2つに限られている。一方で、自然界の土壌中では、Fe(III)の還元と共役したアンモニア酸化反応が進行し、 N_2 などが生じるフェアモックス反応が知られている[3]。しかし、複雑な土壌内反応の機構に関しては詳細な検討が困難であり、生物反応の関与すら明確になっていない。ここで、固体のFe(III)が還元されていることから、細胞外膜の酸化還元蛋白質(外膜シトクロム)を介して細胞外物質に直接電子を受け渡す細胞外電子移動(Extracellular Electron Transport, EET)を行う微生物の関与が考えられる。本研究では、EETを行う鉄還元細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 を用いて、EETと共役したアンモニア酸化反応が進行するか電気化学測定系を用いて検討した。 NH_4^+ を唯一の電子源とし、作用極に0.4 V(vs. 標準水素電極)を印加した嫌気3電極系にMR-1株を導入すると、酸化電流値の上昇が観測された。MR-1株は既知のアンモニア酸化代謝経路を持たないことから、この結果は、これまで予想されていなかった第3の反応経路をMR-1株が有している可能性を示唆している。さらに、同位体基質と蛍光試薬を用いた実験により、一酸化窒素(NO)の生成が確認された。当日はこの新規嫌気アンモニア酸化における酸素源、およびこの反応のフェアモックスに対する関与についても詳しく議論する。引用文献：[1] I. M. Head *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, **1993**, 139, 1147 [2] M. Strous *et al.*, *Nature*, **1999**, 400, 446 [3] W. H. Yang *et al.*, *Nature Geosci.*, **2012**, 5, 538

作田 郁子¹, 水口 千穂¹, 小曽根 郁子², 橋本 絢子², 小松 護³, 新家 一男⁴, 池田 治生³, 森内 良太⁵, 道羅 英夫⁵,
新谷 政己⁶, 岡田 憲典¹, 野尻 秀昭¹

¹東大生物工学セ, ²JBIC, ³北里大・北里生命研, ⁴産総研, ⁵静大・グリーン研, ⁶静大院・総合科技

【背景・目的】プラスミドの接合伝達は受容菌に新規形質を付与するという特徴から、その利用や制御を目指した技術開発が期待されており、利用や制御の場としての実環境中でのプラスミドの接合伝達様式を知ることは重要である。本研究では、種々の細菌が混在する実環境中での接合伝達を想定し、供与菌1種に対し受容菌が同時に2種存在する接合（1:2接合）を行い、第2の受容菌候補の存在がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価、および複数の受容菌の存在下でプラスミドの挙動を決定する因子の探索を目的とした。【方法・結果】異なる不和合性（incompatibility; Inc）群に属する4種のプラスミドpCAR1（IncP-7）、NAH7（P-9）、pB10（P-1）、R388（W）について、*Pseudomonas putida* KT2440株および*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4株を宿主とした1:2接合実験を行った。各プラスミドの接合伝達頻度（接合伝達体数／供与菌数）を算出し、1:1接合および1:2接合実験結果を比較した。pCAR1は1:2液体接合条件下で他の受容菌の共存による影響を受けず、各受容菌へ1:1接合時と同程度の頻度で接合伝達した。それに対し、他の3種は、それぞれ程度は異なるものの、1:2液体接合時に供与菌と同種の受容菌へより優先的に接合伝達する傾向が観察された。同様の傾向は固体培地上での接合時にも見られた。この「2種の受容菌を見分けて接合伝達する」現象の原因因子は供与菌、受容菌、プラスミドのいずれにも存在し得る。本研究では、1:2接合条件下でNAH7がKT2440株からCA10dm4株へほぼ接合伝達しない現象に着目し、受容菌由来因子の探索を行った。KT2440株ゲノムから作製したBACライブラリーを受容菌CA10dm4株染色体上に挿入し、1:2接合時にNAH7の接合伝達が可能となった株を300個のライブラリーより16株取得した。取得した株に導入されたBACクロンのシーケンス解析の結果、KT2440株染色体上の複数の異なる領域の関与が示唆された。また、4つのBACクロンで共通した約70 kbの領域など、5か所の領域が複数のBACクロンで共通していた。発表では、現在行っているBACクロンのサブクローン化による作用領域の絞り込みの結果も報告する。

動物や植物はもちろんのこと、菌類にも「絶滅危惧種」が存在することは間違いない。しかし、本来であれば成熟個体数、個体群の減少、生息地面積など、いわば定量的要件により絶滅危惧性が判断されるべきである。この基準を菌類など微生物にあてはまることが容易ではないことは明らかで、厳密に定量的要件のみを適用しようとすると、ほとんどの菌類が判定不能になってしまうことであろう。

菌類の中で、最もそのような定量的要件による判定がしやすそうなのが、いわゆるきのこ類である。肉眼での発生確認ができるため、発生状況や分布のデータを取得することができるからである。しかし、絶滅危惧性を判定するにあたっては、きのこの子実体の発生量や発生頻度が、その種の希少性（もしくは絶滅危惧性）とどの程度相関があるかはわからない。また、子実体を観察・採集するだけでは個体数を把握することは不可能であるため、やはり絶滅危惧性を判定することはできない。

多くのきのこ類の子実体発生には季節性や年変動があり、長期間にわたり子実体の発生が確認されていないとしても、菌糸や胞子の状態で生存している可能性は捨てきれない。そのような理由から、過去60年以上にわたり子実体の発生が確認されていないことから「絶滅種」として環境省のレッドリストに掲載されている計26種の菌類が、本当に絶滅した種なのかを判定することは、子実体もしくは既存標本のみに基づく限り、非常に困難である。

我々の研究室ではそのような「絶滅種」きのこを再発見すべく、特に小笠原諸島での調査を継続している。しかし子実体として再発見するのは難しい可能性があるため、土壌や木材基質といったサンプルから環境DNAとして検出する可能性を探り、その第一段階として「絶滅種」のタイプ標本からDNAデータの取得を目指している。本発表では、「絶滅種」計26種のうち、標本の所在が確認できた計16種20標本からのDNA抽出～シーケンスの結果を報告する。また、「絶滅種」のうちカバイロチャダイゴケ *Cyathus badius* およびオガサワラチチタケ *Lactarius ogasawarashimensis* の2種類の子実体から再発見した可能性についても報告する。

白水 亙¹, 松岡 俊将², 長太 伸章³, 保坂 健太郎⁴, 土居 秀幸²¹三重大学大学院生物資源学研究所, ²兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科, ³国立科学博物館標本資料センター, ⁴国立科学博物館植物研究部

真菌類の多様性探索法は、古くは子実体（きのこ）採集にはじまり、培地による菌糸体の分離培養、DNAクローニングや次世代シーケンサーを用いた環境DNA解析と、技術の進歩とともに発展してきた。これらの方法にはそれぞれ利点と欠点があり、例えば、子実体採集は安価だが子実体の発生や調査者のスキルに依存し、分離培養は子実体発生に依存しないが培養条件による制約のため過小評価となる。近年発展してきた環境DNA解析は子実体発生や培養条件等に左右されない高感度の検出を可能とし、これまで未知系統を含む様々な真菌類の多様性を明らかにしてきた。しかし、得られる情報は多くの場合数百bpの塩基配列であり、検出された配列に近縁な系統群は推定できるが、それが由来する生物の種同定や生理生態的特性の解明には他の手段を併用しなくてはならない。このように、真菌類の多様性探索法はそれぞれ一長一短があり、目的に合わせて効率的な方法を選択する必要がある。

Shirouzu et al. (2016)は、これらの方法を併用した相補的多様性探索を目的とし、アカマツ材を基質とする木材腐朽菌アカキクラゲ綱（担子菌門、菌界）を対象に、子実体採集、分離培養（改変Dilution to Extinction法）、環境DNA解析（DNAクローニング法）による多様性探索を行った。筑波山のアカマツ林における1年間11回の調査の結果、分離培養と環境DNA解析によって、子実体では確認できなかった14 OTU（Operational Taxonomic Unit）が検出された。系統推定の結果、これらのOTUには進化初期に分岐する3系統を含む10の未知系統が認められた。OTUのrarefaction curveから、子実体採集では11回目の調査で新規OTU数がほぼ頭打ちになるが、分離培養と環境DNA解析ではさらに調査を継続することでより多くの新規OTUを検出する可能性が示唆された。これらの結果を踏まえた今後の検討課題として、より長期間にわたるサンプリングと次世代シーケンサーを活用したより高感度な多様性検出の必要性が示された。

そこで現在は、子実体採集、分離培養、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いた環境DNA解析により、菅平高原のアカマツ林にて3年間の調査計画でアカキクラゲ綱の多様性探索を行っている。本発表では、1年目の調査結果について報告し、真菌類の効率的な多様性探索法について考察したい。

大和 政秀¹, 折原 貴道², 大前 宗之³¹千葉大・教育, ²神奈川県博, ³(株)北研

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌 *Glomus microcarpum* Tul. & C. Tul. は *Glomus* 属の基準種である *Glomus macrocarpum* とともに 1845 年に記載され (Tulasne and Tulasne, Giornale Botatico Italiano 2: 35-63, 1845)、その後の研究において詳細な胞子形態とともに、ポットカルチャーにおける菌根形成が報告されている。しかし、菌株は維持されておらず、データベース上に本種の DNA データは全く存在しない。このため *Glomus* 属の初期記載種の一つであるにもかかわらず、本種の分子系統学的位置は不明であった。演者らは 2015 年 7 月に宇都宮市のヤブツバキ樹下において白色の胞子果 (15 × 13 × 10 mm) を採取した。この胞子果は直径 34.4–43.5 × 35.2–49.0 (mean 38.6 × 39.5; n = 30) μm の白色の厚壁胞子によって形成されており、胞子壁が 4.8–7.6 (mean 6.5; n=30) μm と厚く、菌糸から胞子内部まで隔壁を経ずに細く繋がっている特徴などから、*G. microcarpum* と同定された。他にも 2014 年 7 月に同様の胞子を採取している。これらの胞子果について AM 菌のバーコード領域として推奨されている SSU-ITS-LSU rDNA 領域の塩基配列 (1548–1553 bp) を取得し、GenBank に登録されている Glomeraceae の配列とともに分子系統解析を行ったところ、Glomeraceae の 5 属 (*Glomus*, *Funnelformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Septoglomus*) のいずれにも該当せず、近年提案された新属 *Kamienskia* (Blaszkowski et al., Nova Hedwigia 100: 225-238, 2015) と近縁な関係にあることが示唆された。また、AM 菌の群集解析に多用される SSU rDNA の部分塩基配列領域 (NS31/AML2) について、GenBank データベースに対する BLAST 検索を行ったところ、99% 以上の相同性を有する配列が、アジア、ヨーロッパ、北米、南米、オーストラリアの森林、農地、乾燥地などの環境から得られていることが示され、本種もしくはその近縁種が世界的に広く分布している事が示唆された。

田留 健介¹, 大村 嘉人², Zhurbenko P. Mikhail³¹埼玉県自然学習センター, ²国立科学博物館植物研究部, ³Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences

地衣生菌は、地衣類をおもな宿主とし、多くは属または種レベルで宿主特異性があるとされている。世界で約2000種の確認されており、ほとんどが子嚢菌類（約95%）で、わずかに担子菌類（約5%）の報告がある。日本産からは95種が報告されているが、本地域での地衣生菌相はまだ3割程度しか分かっていないと見積もられている。本研究では、日本産地衣生菌相解明の一環として、地衣生菌の宿主としてよく知られているニクイボゴケ属 *Ochrolechia*（トリハダゴケ目ニクイボゴケ科）に着目した。材料には国立科学博物館収蔵のニクイボゴケ属標本729点を用いて、地衣生菌の有無を実体顕微鏡下で確認し、生物顕微鏡により詳細構造を調べた。その結果、79点の標本で地衣生菌の感染を確認し、これまでに13種を認めることができた。これらのうち、*Lichenodiplis lecanorae*, *Muellerella lichenicola*, *Pyrenidium actinellum*, *Sphinctrina tubaeformis*の4種は日本からの報告がすでにあり、ニクイボゴケ属を含む固着地衣類に寄生することが国外でも広く知られている。残りの9種は、*Dactylospora*, *Lichenodiplis*, *Lichenostigma*, *Pronectria*, *Roselliniopsis*, *Sagediopsis*, *Skyttea*, *Sphaerellothecium*に所属するが、日本新産種または新種の可能性があるため、詳細な検討を行っている。国立科学博物館収蔵のニクイボゴケ属全標本に対する地衣生菌の感染率は11%であった。今回確認された全ての種は、宿主の地衣体や子器に対する奇形・黒色化などの影響を与えているものであり、子嚢層内感染タイプの地衣生菌は確認されなかった。なお、一般的な地衣類標本は基本的に非感染のサンプルを選択して採集することが多い。実際の野外では地衣生菌に感染した個体がさらに見つかる可能性があるため、今後は詳細な現地調査も行っていく予定である。

加藤 真悟, 鈴木 勝彦

海洋研究開発機構・SIP成因研究ユニット

海底熱水噴出域で一般的にみつかるとされる硫化沈澱物は、還元的な熱水に含まれる硫化水素と重金属が海底面・下で冷やされて、硫化鉱物として沈殿することで形成される。一度形成されたチムニー状やマウンド状の硫化沈澱物は、熱水活動が終わった後も、数千年以上海底に残存することもある。硫化沈澱物の主要鉱物である黄鉄鉱や磁硫鉄鉱は、還元型の硫黄と鉄を含む。これらの還元型硫黄・鉄は、たとえ熱水活動が終わった後の冷たい、そして暗い深海底の環境下でも、化学合成生態系を支えるエネルギー源となり得る。実際に、これまでの研究によって、「冷たい」深海底面・下の硫化沈澱物には、微生物が豊富に存在し（ $\sim 10^9$ cells/g）、ニトロスピラ門やデルタプロテオバクテリア綱、ガンマプロテオバクテリア綱に属する未培養種が卓越することが明らかにされている（1,2,3）。しかしながら、これらの未培養種の代謝機能に関する手がかりは、ほとんど得られていないのが現状である。本研究では、これら未培養種の代謝機能を推定するために、海底掘削によって採取した海底下硫化沈澱物のメタゲノムショットガンシーケンシングによって、ゲノム配列の再構築を試みた。その結果、上記の系統群に属するいくつかの未培養種のほぼ完全なゲノム配列を得ることに成功した。これらのゲノム配列からは、炭酸固定、窒素固定、各種の硫黄化学種（硫化水素、チオ硫酸、硫酸）や窒素化学種（亜硝酸、硝酸）、水素の酸化還元に関わる酵素や、マルチヘム型の細胞外シトクロムcをコードする遺伝子が見い出された。本発表では、再構築したゲノム配列の解析結果を元に、暗くて冷たい深海底の、硫化鉱物をエネルギー源として成り立つ化学合成生態系について議論する。1) Suzuki et al. Microb. Ecol. 2004;47: 186-96. 2) Kato et al. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76: 2968-79. 3) Kato et al. Environ. Microbiol. 2015;17: 1817-35.

Romain Blanc-Mathieu, Genki Yoshikawa, Hiroyuki Ogata
Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University

Molecular analyses of environmental water samples have revealed the diversity of marine eukaryotic viruses. In parallel, the potential significance of their role in marine ecosystems and biogeochemical processes has been increasingly recognized. Nonetheless, little knowledge exists regarding how marine eukaryotic viruses relate to biogeochemical processes. In this study, we make use of 441 eukaryotic meta-transcriptomes to describe the diversity of eukaryotic viruses in the sunlit ocean and to investigate how they relate to environmental factors, such as carbon export. Samples were collected from 68 worldwide, predominantly open ocean stations, at two depths of the sunlit layer and across four size fractions. Meta-transcriptomes were previously assembled to form a catalog of 116M unique genes, of which 32,798 were assigned to eukaryotic viruses. Eukaryotic viral transcripts or RNA genomes were detected in all samples, albeit representing a small proportion (<1%) of the whole meta-transcriptomes, and showed a higher frequency in the pico to nano size fraction with differential viral taxonomic compositions across size fractions. Network analysis revealed strong association of a group of genes with carbon export. These results will be presented along with yet-to-be analyzed virus-host association and the role of viruses in structuring eukaryotic plankton communities.

O-011

同一サイトで分離されたPCB分解性細菌(KF株)10菌株のビフェニル分解系 *bph*遺伝子の多様性

廣瀬 遵¹, 寺野 貴洋¹, 横井 春比古¹, 末永 光², 木村 信忠³, 渡邊 崇人⁴, 二神 泰基⁵, 後藤 正利⁶, 藤原 秀彦⁷, 古川 謙介⁷
¹宮崎大・環境応用化, 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鹿大・農, ⁶佐賀大・農, ⁷別府大・食物栄養

[目的] PCB分解性細菌のビフェニル分解系をコードする *bph* 遺伝子群は可動性遺伝因子上に存在し、環境中で水平伝播していると考えられている。またビフェニル代謝経路をコードする遺伝子群は、同一起源でかつ多様性を示すことから、細菌の芳香環代謝経路の進化に新たな知見を与え得る。本講演では、1980年代に北九州のビフェニル工場で分離された10菌株のPCB/ビフェニル分解菌(KF株)のビフェニル分解系 *bph* 遺伝子の遺伝子構造解析ならびに比較を行った結果について報告する。[結果および考察] 既に遺伝子構造が明らかにされている *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707および *P. putida* KF715由来の *bph* 遺伝子群の他、*Pseudomonas* 属に分類される *P. abietaniphila* KF701、*P. aeruginosa* KF702、*P. putida* KF703、*P. toytomiensis* KF710、*P. stutzeri* KF716および *Cupriavidus* 属に分類される *C. basilensis* KF708、*C. pauculus* KF709ならびに *Comamonas testosteroni* KF712のドラフトゲノム配列から、*bph* 遺伝子群の全領域を見出した。*bph* 遺伝子群は、構成遺伝子の配列に基づいてⅠ～Ⅲ型の3つのタイプに分類することができた。Ⅰ型は、KF702株、KF703株、KF707株、KF709株、KF710株、KF716株からなるタイプで、最も多数の菌株から見いだされた。Ⅱ型はKF701株とKF715株からなるタイプで、*bph* 遺伝子群の基本構造はⅠ型と共通であるが2-hydroxypenta-2,4-dienoateのアセチルCoAへの分解酵素群をコードする一部の領域(*bphX*領域)を欠失していた。Ⅲ型はKF708株とKF712株からなるタイプで、既知の *Acidovorax* sp. KKS102株由来の *bph* 遺伝子と共通の構造で *bphX* 領域が *bph* 遺伝子群の上流側に位置する特徴を示す。遺伝子クラスターの各々の構造遺伝子の塩基配列の比較を行った結果、同じ型の *bph* 遺伝子どうして高い相同性を示したが、KF716株の *bph* 遺伝子群は、複数の型と高い相同性を示すモザイク様構造を呈していた。また、Ⅲ型の *bph* 遺伝子群の転写制御因子(*bphS*)は、Ⅰ型およびⅡ型の転写制御因子(*bphR*)とは機能が異なることが既に明らかにされている。以上のように、同一サイトで分離されたKF株のゲノム上に存在する *bph* 遺伝子群は3つのタイプが存在していて、部分的な欠失やグループ間での組み換えなどの再編成を経ていることが裏付けられた。

河合 幹彦¹, Nancy Merino², 白瀧 千夏子¹, 木原 久美子¹, 本郷 裕一^{1, 2}

¹東工大・生命理工, ²東工大・ELSI

Single-cell genomics can substantially improve in-depth comparative studies for uncultivated microorganisms. By comparing several genome sequences of closely-related microorganisms, a reconstruction of the genomes' evolutionary history can be achieved.

However, single-cell genomics of prokaryotes has faced many difficulties, including isolation of single cells, cell lysis, and amplification of genomic DNA. The quality of genome completeness differs between samples due to the inconsistent recovery and uneven amplification of DNA.

Here, we present a statistical approach to quantitatively assess the extent of genome completeness and amplification bias of whole-genome amplified single-cell genomic DNA. The assessment is based on up to about 1x depth of coverage, which corresponds to as few as 10,000 reads for the size of a prokaryotic genome. We demonstrate that this approach correlates well with genome completeness at greater sequencing depths. Based on these observations, we discuss the feasibility of conducting a preliminary sequencing run for many barcoded samples to select for samples with good quality.

従来トランスポゾン(Tn)変異株ライブラリーより目的の表現形を有するクローンを選び出し、そのTn挿入部位を明らかにすることで、当該表現形に関わる遺伝子を同定することが行われてきた。近年では、次世代シーケンサーを利用して、Tn挿入部位を一括して同定するTnSeq法が用いられるようになってきている。これまでのTnSeq法では、Tn挿入部位を解析する過程でPCR増幅を行うため、最終的に得られるリード数が各Tn挿入DNA分子数を必ずしも反映しないという問題点があった。本研究では、固有識別タグを用いることでPCR増幅によるバイアスを排除することで定量性を高めた定量的TnSeq(qTnSeq)法の構築を目指した。これまでに用いられてきたTnカセットは、必ずしも次世代シーケンサーによる解析を前提にデザインされたものではなかった。本研究では、最も高精度かつ大量のリードが取得可能なイルミナシーケンサーの使用を前提に、Tnカセットを各種の観点からデザインし、人工合成したものをベースに各種の薬剤耐性マーカーを有するものを作製した。Tnカセットを用いてPCB分解細菌*Acidovorax* sp. KKS102株のおよそ6万クローンよりなるTn変異株ライブラリーを作製した。本変異株ライブラリーより回収したDNAを超音波により剪断した後、末端平滑化とMMLV逆転写酵素によるtailing反応を行い、突出末端に対して相補的な末端とこれに続く固有識別タグを有するアダプターDNAを連結した。さらにPCRを行ってシーケンスライブラリーとし、イルミナシーケンサーでの解読を行い、およそ6万箇所の挿入位置を同定することができた。このクローン数は十分にゲノムを網羅していると考えられることから、Tnカセットが挿入されなかった遺伝子、すなわちKKS102株の生育に必須である遺伝子について同定できたものと考えている。

酒井 香奈江^{1,2}, 原 康雅³, 石橋 正巳³, 酒井 麻衣⁴, 川原 聖也⁴, 今西 進⁴, 原田 健一⁴, 五ノ井 透¹
¹千葉大・真菌セ, ²神戸大・イノベ, ³千葉大・薬学, ⁴名城大・薬学

【目的】 Nocardithiocinは、病原性放線菌である*Nocardia pseudobrasiliensis*から分離・同定されたthiopeptide化合物で、多剤耐性の結核菌にも有効に作用することが分かっている [1]。有用な活性を持つnocardithiocinは新たな治療薬として期待される化合物であるが、光感受性や水への溶解度が低いことが報告されており、今後の改良が求められている。Nocardithiocinの生合成は他のthiopeptide化合物と同様に、リボソームで合成されたペプチドが骨格となり、様々な修飾を受けて最終産物が合成されると推定されている。そこで、遺伝子への変異導入により骨格ペプチド(precursor peptide)内のアミノ酸を置換することで様々な誘導体を比較的容易に作ることが可能であると考えた。我々は既にnocardithiocinの生合成遺伝子クラスターを同定しており[2]、遺伝子配列情報の利用が可能であることから本研究では遺伝子組み換え技術を用いることでnocardithiocinの誘導体作製を試みた。【方法と結果】 アミノ酸置換を行うにあたり、野生型のprecursor peptide遺伝子(*notG*)の欠損株を作製し、欠損株がnocardithiocinを生産しないことを確認した。本研究では、ペプチド骨格の環化反応に影響が少ないと考えられる位置のアミノ酸1つを変異導入により置換することにした。PCR法を用いて19種類の*notG*変異vectorと相補用のvectorを作製した。作製したvectorをそれぞれ*notG*欠損株に導入して、nocardithiocinあるいはその誘導体の生産を確認した。変異入りの*notG* vectorを導入することで、19種類のアミノ酸置換のうち10種類のアミノ酸置換で誘導体と思われる物質の生産が確認できた。さらにLC-MS/MS分析により6種類のアミノ酸置換で目的とした誘導体の生産が確認され、目的とした誘導体以外の構造をした物質の生産も見られることが分かった。最後に、作製された物質の光感受性、溶解度、抗菌活性などの性質についてnocardithiocinとの比較を行った。【参考文献】 [1] A Mukai, T Fukai et al. J Antibiot. 62, 613-619 (2009). [2] K Sakai, H Komaki et al. PLOS ONE, (2015).

石賀 康博¹, 石賀 貴子¹, 一瀬 勇規², 野村 暢彦¹¹筑波大・生命環境, ²岡山大・院環境生命

Reactive oxygen species (ROS) have a crucial role in plant defense responses and signaling pathways. In addition, ROS also have direct toxicity against invading pathogens. Alginate is known to protect the bacterium from oxidative stress. However, the molecular mechanisms of plant ROS in the direct effects against pathogens is still unclear. To investigate the function of plant ROS in the interactions of plant and bacterial pathogens, we focused on the oxidative stress-regulated transcription factors including OxyR and FinR, and sigma factor AlgU, a key regulator involved in alginate biosynthesis, and generated $\Delta oxyR$, $\Delta finR$ and $\Delta algU$ mutants in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000). The *Pto* DC3000 $\Delta oxyR$ and $\Delta finR$ mutants showed high sensitivity to oxidative stress in comparison to the wild-type. The host plants of *Pto* DC3000 including tomato and *Arabidopsis* inoculated with the $\Delta oxyR$ and $\Delta algU$ mutants showed reduced disease symptoms as well as reduced bacterial populations. Expression profiles of *Pto* DC3000 genes revealed that OxyR regulates the expression of genes related to oxidative stress including catalases. We also demonstrated that AlgU regulates not only genes involved in alginate biosynthesis but also genes related to type III secretion system. These results suggest that OxyR and AlgU have an important role in the virulence of *Pto* DC3000.

富田 駿¹, 辻井 良政¹, 梶川 揚申¹, 五十君 静信¹, 篠原 弘亮², 横田 健治¹¹東京農大・生応化, ²東京農大・農

<研究背景>Tolaasinはキノコ腐敗病病原菌*Pseudomonas tolaasii*が産生する環状リポペプチドである。現在、キノコ類の細菌病害に対する登録農薬はなく、生物農薬の開発が期待されている。七海(2010)は、健全なシイタケ子実体からtolaasin解毒能を持つ*Microbacterium*属K3-5株を分離した。本菌株の解毒機構は未解明であり、本菌を利用した生物防除剤の開発において、その解毒機構の解明は重要となる。そこで、本報ではK3-5のtolaasin解毒様式について報告する。K3-5をKing'sB培地で25℃、24時間振盪培養した培養液2.5mlに精製したtolaasinを終濃度0.4mg/mlとなるように添加した。2時間培養後、上清中のtolaasin残存量をHPLC分析により評価したところ、添加したtolaasinの75%を除去した。前項の培養液から遠心分離とろ過滅菌により培養上清を調製し、精製tolaasinの除去率を評価したところ、除去活性は認められなかった。培養液の遠心分離により得られた菌体をPBSに懸濁し、精製tolaasinの除去活性を評価した。菌体懸濁液には84%のtolaasin除去活性が認められた。また、HPLCのクロマトグラム上に、反応生成産物と思われるピークが検出された。そこで、LC-MS/MS解析を行ったところ、前述のピークのm/zは1003.62 (M+2H)²⁺となり、tolaasinのm/z 994.61 (M+2H)²⁺に対して18Daの差分が生じた。さらに、フラグメントイオンのスペクトルパターンからtolaasinCと一致した。TolaasinCはtolaasinの環状構造を加水分解した構造であり、抗菌活性を示さないことが報告されている。なお、菌体懸濁液処理後の上清抽出物についてジャガイモ塊茎切片の褐変を指標とした生物検定を行ったところ83%の解毒率に相当した。<総括>K3-5によるtolaasin解毒機序はtolaasinを加水分解反応による環状構造の開環により無毒化することを明らかにした。更に、tolaasinに対する触媒反応には菌体が必要であり、解毒因子を菌体外に分泌しないことを明らかにした。Hoeflerら(2012)は、*Streptomyces*属による環状リポペプチドsurfactinの分解には分泌型の加水分解酵素による環状構造の開環によるものと報告した。本研究におけるK3-5のtolaasin解毒は加水分解による開環反応においては同様であるが、菌体へのtolaasinの吸着が必須となる点がsurfactin分解機構とは異なった。

Auliana Afandi¹, Masyahit Masanto², Arif Wibowo², Siti Subandiyah², Supriyono Loekito³, Afandi -⁴, Haruhisa Suga⁵, Koji Kageyama⁶

¹UGSAS, Gifu Univ., ²Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada, ³Great Giant Food Co., ⁴Faculty of Agriculture, Universitas Lampung, ⁵Life Sci. Res. Center, Gifu Univ., ⁶River Basin Res. Center, Gifu Univ.

Indonesia is an agricultural country with more than 30 million farmers nationwide most of it with poor disease management. An identification of a pathogen is the first step to establish efficient management strategies for disease control. Indonesia has significant landscape diversity. The coastal lowland area are hot temperature and high humidity, while the highland or plateau area are much colder. In this study, we survey the diversity of oomycetes in horticulture. Samples were collected from 19 sites around Lampung, Sumatera and Central Java Islands. The elevations range between 38 and 1460 M above sea level. The oomycetes were isolated from rhizosphere soils sample and from symptomatic plants tissues. Seventy isolates belonging to four *Phytophthora* spp. nine *Pythium* spp. and one *Phytophythium* sp. were identified. *Ph. nicotianae* was a predominant species from pineapple but also found in cabbage, chili, and chrysanthemum. *Phytophthora colocasiae*, *Ph. palmivora*, *Py. ultimum*, and *Phy. vexans* were isolated from high elevation site, while *Ph. capsici*, *Py. acanthophoron*, *Py. myriotylum*, *Py. nodusum*, *Py. splendens*, *Py. spinosum*, and *Py. catenulatum* were isolated from the lower elevation area. On the other hand, *Ph. nicotianae* and *Py. peritum* were isolated from both higher and lower elevation level area. Two new *Pythium* species candidate were also isolated from tomato and tobacco.

馮 文卓^{1, 2}, 日恵野 綾香², 楠 幹生³, 須賀 晴久⁴, 景山 幸二²¹岐大院連農, ²岐大流域研セ, ³香川農試病害虫防除所, ⁴岐大生命セ

香川県のレタス栽培では*Phytophthora*および*Pythium*属菌による病害が問題となっている。病原菌は、*Phytophthora pseudolactucae*, *Pythium irregulare*, *Py. uncinulatum*および*Py. spinosum*が報告されている。そこで、LAMP法を用いて、香川県のレタス栽培圃場における主要な病原菌、病原菌の感染部位および土壌汚染実態を調べた。

レタスの収穫時期である2016年2月に萎凋症状を呈しているレタスを二圃場で採取し、検出を試みた。その結果、圃場Aでは、*Ph. pseudolactucae*が髓部から主に検出され、根からも*Py. uncinulatum*が検出された。圃場Bでは、髓部からは何れの病原菌も検出されなかったが、根部から*Py. uncinulatum*あるいは*Py. spinosum*が検出された。さらに、植物体への感染部位および土壌の汚染状況を詳細に調べるため、2016年12月に、三圃場からサンプリングを行った。罹病植物体は髓部と根の基部および先端に分けて、LAMP法に供した。圃場1では、髓部からは*Ph. pseudolactucae*が主に検出され、*Py. uncinulatum*が検出される場合もあった。圃場2では、髓部と根の基部および先端から*Py. uncinulatum*が検出された。圃場3では、髓部から*Ph. pseudolactucae*のみが検出され、根の基部から三種*Pythium*属菌、先端から*Py. uncinulatum*が検出される場合があった。土壌からは主に植物体から検出された種が検出され、これに加えて他の種も検出される場合があった。

以上の結果から、1) 同じ萎凋症状でも、*Phytophthora*あるいは*Pythium*単独、および両者による発病がある; 2) *Ph. pseudolactucae*は地際部の髓部から感染し髓部を腐敗させるのに対し、*Pythium*属菌は主に根、特に*Py. uncinulatum*は根の基部と先端両方から感染して根腐れを引き起こす; 3) 土壌に存在する病原菌はすべてレタスに感染することはない; 4) *Py. irregulare*と*Py. spinosum*による病気の発生の程度は他の二種より低い; ことが明らかになった。また、LAMP法は植物や土壌中の病原菌の診断に有効に利用可能であることが明らかになった。

小松 あき子¹, 近藤 秀樹², 佐藤 真之³, 鈴木 信弘², 藤森 文啓¹¹東京家政大・院, ²岡山大・IPSR, ³雪国まいたけ

近年、菌類に感染する新規マイコウイルス（菌類ウイルス）の存在が次々と報告されており、担子菌のキノコにおいても各種マイコウイルスが分離されている^{1),2)}。我々は、人工栽培が確立しているマイタケの子実体形成メカニズムを遺伝子レベルから解析するために、マイタケ株（Gf-N2）のゲノム配列情報³⁾とトランスクリプトーム情報⁴⁾を取得し、子実体形成に関わる因子の探索を進めている。その研究過程で2種の新規RNAウイルスGrifola frondosa partitivirus 1 (GfPV1) とGrifola frondosa RNA virus 1 (GfRV1) が重複感染していることを発見した。まず、両ウイルスのウイルスフリー株（Gf-VF株）を作出し、そのGf-VFにGfPV1およびGfRV1を単独感染させたGfPV1単独感染株（Gf-VF(PV)株）とGfRV1単独感染株（Gf-VF(RV)株）をそれぞれ作出した。その結果、2種ウイルスの有無による菌糸伸長や子実体形成に明確な差は認められなかった。しかしながら、温度シフト試験を25℃・10日間培養後、10℃以下の低温培養で行ったところ、Gf-VF(RV)株においてのみGfRV1蓄積量が経時的に増大することを見出した。GfRV1蓄積量の増大に伴って発現が変動するマイタケ内在遺伝子群の探索を、マイクロアレイを用いて行った。具体的には、Gf-VF(RV)およびGf-VFの菌糸を25℃で前培養後、温度シフト前を0日目、低温(4℃)にシフト後1日目、3日目、5日目として菌糸を回収し、両者の遺伝子発現を比較した。Gf-VF(RV)株におけるGfRV1発現変動と類似した経時的変動を示す遺伝子群（遺伝様配列）、経時的に発現が上昇する遺伝子群、反対に経時的に発現が低下する遺伝子群が抽出されたので、更にクラスタリング解析を進めている。¹⁾Grogan et al. (2003) *Mycol. Res.* 107 (2): 147-154, ²⁾Magae et al. (2010) *Virology* 407:342, ³⁾Sato et al. (2013)*Bull. Tokyo Kasei Univ.*53:17-30, ⁴⁾Kurahashi et al. (2012) *Bull. Tokyo Kasei Univ.*52:17-32.

高橋 由紀子, 窪野 高徳
森林総研

スギ黒点病菌 *Sydowia japonica* は、スギ雄花を選好し、枯死させることから、現在本菌を利用したスギ花粉飛散抑制技術の開発研究が行われている。微生物農業としての利用を目指す上で、実際に自然感染が起こっている林分における本菌の動態を把握する必要がある。本研究では、本菌の伝染機構を明らかにすることを目的として、野外のスギ林で自然感染した雄花における本菌の感染率と生存年数を調査すると共に、本菌の遺伝子型の空間分布を調査した。2014年11、12月（高橋・窪野 2015）の調査に引き続き、2015年5月および2016年6月に、福島県西会津町と島根県飯南町（以下西会津、飯南）のスギ人工林において、生立木から本菌に感染した枝を採集し、雄花の感染率を計数した。本菌の自然条件下における感染率は、枝ごとに大きくばらつき、枝によっては9割近く感染しているものもあったが、おおむね2、3割程度であった。雄花内での生存年数は、2年以上生存しているものもあるが通常は1年程度で、感染直後の11、12月に比べて、越冬後の5、6月には分離率が低下する傾向があった。一方、2014年に得られた菌株からDNAを抽出し、*S. japonica* の種特異的プライマーを用いて、西会津79菌株、飯南293菌株を選抜し、9つのマイクロサテライトマーカーを用いて、西会津50菌株、飯南212菌株の遺伝子型を同定した。得られた遺伝子型多型と各菌株が得られた雄花の位置情報を元に、空間的自己相関を解析した結果、各菌株の遺伝的な距離は、75cm以下の距離階級で有意な正の自己相関があり、枝内のジェネットは遺伝的に類似していると考えられた。一方、10～50mの距離階級では有意な負の自己相関があり、樹木間では遺伝的に異なっていると考えられた。本菌の各枝におけるジェネット組成は多様であり、主に有性孢子により感染していると推測されている（高橋ら2016）が、空間解析の結果からも、本菌は子のう孢子により、主に同一樹木内の枝間の短い距離で伝染していると推測された。

別役 重之¹, 石賀 貴子², 石賀 康博¹, 野村 暢彦¹¹筑波大・生命環境, ²筑波大・院生命環境

植物は微生物病原体の感染に対して防御応答を発動する。これまでの遺伝学や分子生物学、生化学を中心とした解析により、病原体の認識から防御応答に至るおおよその分子機構が理解されつつある。その結果、病原体分子パターンを認識して誘導されるパターン誘導免疫（PTI）や、病原体エフェクターを認識することで誘導されるエフェクター誘導免疫（ETI）といった概念が生まれ、それらに必要な植物ホルモンであるサリチル酸（SA）の重要性が広く認知されるようになってきた。しかし、本来、感染は局所的に起きる現象であり、植物免疫も時空間的に制御されているはずであるが、そのような時空間的観点からの植物免疫に対する理解はあまり進んでいない。

そこで、プロモーターレポーターシロイヌナズナ植物とライブイメージングを用いて、植物防御応答の時空間的動態を可視化する系を構築した。その結果、*AvrRpt2*を持つ*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst_a2*) の注入接種によるETI時には、SAと相互拮抗関係にあるジャスモン酸（JA）シグナル系が感染部位の外側細胞群で活性化することで、感染細胞周辺でのみSAが高蓄積し、感染部位での細胞死領域とそれをリング状に取り囲むSA依存性防御領域が形成されることを見出した。このように、植物は病原体の感染部位を中心として、空間的なSA-JA拮抗作用を産み出す同心円的なETI免疫反応場を形成することで、強力なSA依存性防御を感染局所に限定している可能性が示唆された。さらに、病原細菌の側にも目を向け、上記ETI時における注入した*Pst_a2*細胞の局在を、GFPを用いて調査した。その結果、接種後24時間では、ETIという強力な防御応答が発動した後も関わらず、*Pst_a2*はETI反応場の細胞死領域中において、バイオフィルムと考えられる小さなコロニーとして点状に存在していることを見出した。本発表では、我々が取り組んでいるイメージング技術を用いた時空間的な植物免疫システム解明の取り組みを紹介したい。

馬場 保徳^{1, 2, 3}, 松木 悠², 馬場 (森) 裕美^{1, 2}, 陶山 佳久², 多田 千佳², 福田 康弘², 三宅 克英¹, 齋藤 雅典², 中井 裕²
¹石川県大・資源研, ²東北大・院農, ³日本学術振興会特別研究員

【背景・目的】われわれは、ウシと畜廃棄物であるルーメン液を用いたメタン発酵前処理法を考案し、古紙や草本類のメタン収率が向上することを報告してきた。本研究では、前処理およびその後のメタン発酵過程においてリグノセルロース分解に関わる細菌を明らかにするべく、次世代シーケンサーによる群集構造解析に取り組んだ。【材料・方法】ナタネ栽培残さ（おもに茎葉）を、ルーメン液により37℃で処理（以下、ルーメン処理と表記）し、その処理物をメタン発酵に供した。ルーメン処理液およびメタン発酵液から経時的にDNAを抽出し、16S rDNAのV3-V4領域を増幅した後、次世代シーケンサーMiSeqにより配列情報を得て、QIIME softwareにより解析した。アサイン（97% sequence similarity）された全taxaの代表配列は、Blast検索によりその最近縁種を決定した。酵素活性測定は、Mshandete et al. (2005) の方法に準じた。【結果・考察】ルーメン処理液から7種類のセルロース分解細菌、25種類のセロオリゴ糖分解細菌、11種類のキシラン分解細菌に近縁な配列を検出した。とくに、*Ruminococcus albus*と *R. flavefaciens*の存在割合は経時的に増加し、最終的に両者で全OTUの48%を占めた。酵素活性の経時的観察は、ルーメン処理6時間目にセルロースおよびキシラン分解活性が高まり、24時間目にオリゴ糖分解活性が高まることを示した。これらの結果から、6時間目頃を境に*Ruminococcus*の生産する酵素が多糖分解性のセルラーゼ・キシラナーゼからオリゴ糖分解性の β グルコシダーゼに切り替わったか、マイナーな多糖類分解性微生物が6時間目に酵素生産した可能性が考えられた。一方、本研究は、リグニン由来芳香族化合物の分解に関与するであろう7種類の細菌も検出した。既往研究で、リグニン分解に関与するルーメン細菌の報告は殆ど無い。本研究で検出された細菌の生理的性質から、リグニン由来芳香族化合物は、Benzoateを経て酢酸へ変換されている可能性が示唆された。また、上述したルーメン細菌のメタン発酵過程での挙動についても追跡した。本研究で得られたリグノセルロース分解者を記載したリストは、今後のルーメン微生物に関する研究にとって、有用な基礎的知見と成り得る。

岡野 邦宏¹, 松尾 歩¹, 小林 貴司², 村山 力則², 藤林 恵¹, 木口 倫¹, 宮田 直幸¹¹秋田県立大学生物資源科学部, ²秋田県健康環境センター

発ガン作用の疑いがあり、かつ難分解性である1,4-ジオキサンは一般的な廃水処理施設においては処理できないとされていた。しかし、秋田県内の産業廃棄物処理施設において生物処理の実績があり、分解細菌の存在が予想されている。そこで、本研究では1) 平板培養法を用いて1,4-ジオキサン分解細菌の特定を行い、2) 次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析により現地活性汚泥中での分解細菌とその他の微生物および環境因子の影響を調査した。また、これまで経験的に現地活性汚泥でリンの添加が行われており、3) 処理効率向上のためにリン添加が分解細菌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。活性汚泥の採取は、2015年4月から2017年1月まで毎月、埋立地処分場跡地で浸出水を処理する活性汚泥処理施設で行った。現地活性汚泥を1,4-ジオキサン濃度50 mg/Lの無機塩培地で集積し、平板培養法により分解細菌の特定を行うとともに、16S rRNA遺伝子アンプリコン解析により真正細菌叢のクロノシーケンスデータを得た。また、リン添加の効果は現地活性汚泥を500 mLデュラン瓶で25°C水浴下で培養して行った。なお、1,4-ジオキサンはヘッドスペースGC/MS法で定量した。現地活性汚泥より *Mycobacterium murale* と相同性100%の1,4-ジオキサン分解細菌を単離した。現地においても *Mycobacterium* sp. は、優占度で2-3倍の変動があるが常に存在しており、1,4-ジオキサン除去への関与が予想された。また、細菌叢多様性に与える環境因子の影響を解析した結果、MLSSの増加が1,4-ジオキサン分解速度の増加に寄与していることが示唆された。現地活性汚泥では1,4-ジオキサンが安定的に処理されていたが、*Mycobacterium* sp. の優占度に大きな変動が確認されたため、リン添加の影響を解析した。リン濃度を0, 60, 120, 180 mg-P/Lと増加すると1,4-ジオキサン分解速度が急激に増加することが明らかになった。さらに、細菌叢クロノシーケンスにより *Mycobacterium* sp. の優占度がリン濃度依存的に上昇することが確認された。現状で、現地活性汚泥におけるリン添加量は終濃度0.41 mg-P/Lのため、効果は得られていないが、リン濃度を上げることによって1,4-ジオキサン分解速度を高められる可能性が示された。

遠藤 銀朗¹, 上明戸 京², 本庄 勇葵², 宮内 啓介²¹東北学院大・工総研・バイオ工学, ²東北学院大・工・環境建設

ヒマラヤ山脈の南部および南東部に位置する南アジア・東南アジアの大河デルタ地帯では、深刻な地下水のヒ素汚染問題が存在する。このため、それら大河デルタ地域の大半において地下水の利用が制限されている。このことが、経済発展の遅滞や地域間の経済格差の助長の原因にもなっている。これらの地域においては、地下水のヒ素はその多くが亜ヒ酸イオンとして溶存している。このヒ素を溶解度の低いヒ酸イオンに酸化した後金属水酸化物などと共沈させて除去することがヒ素を効率的除去するための方法と考えられる。本研究では、アジア開発途上国で採用可能な経済的地下水の生物学的ヒ素除去技術を開発することを目的として、そのためにまず必要な亜ヒ酸酸化のために安価に入手できるコークスをろ材とする散水ろ床方式の亜ヒ酸酸化処理技術について実験的な研究を行った。実験は1/50希釈M9培地に3000ppbの亜ヒ酸態ヒ素を添加した模擬地下水をコークスろ床に還流させる方法で行った。得られた実験結果より、コークスは亜ヒ酸吸着能力を有するがヒ酸吸着能力を有さないこと、およびろ材に表面で増殖する細菌により亜ヒ酸イオンが高速度でヒ酸イオンに酸化されることが知られた。この発表では、この亜ヒ酸還流実験を数回繰り返すことによりコークスろ材表面に集積培養された細菌相についても解析し、このような散水ろ床プロセスにおいて亜ヒ酸酸化を行う細菌群集の特徴についても調べたので報告する。

川畑 亜美¹, 森本 洋輔¹, Rahul Jog¹, 三輪 京子^{1, 2}, 森川 正章^{1, 2}¹北海道大・院環境, ²JST-ALCA

私たちはこれまでに、活性汚泥由来のエストロゲン分解細菌をコウキクサ表層に付着させた疑似共生系によって、ある程度持続的なエストロゲン分解系が構築可能であることを報告してきた。しかし、エストロゲン分解に伴ってウキクサの成長速度は低下する傾向が見られていた。本研究においては、ウキクサの成長速度を回復させる方法として（１）成長促進細菌の共存および（２）成長促進物質の添加について検討した。まず、ウキクサ成長速度低下の原因について調べたところ、エストロゲン分解細菌ではなくエストロゲン分解に伴う代謝産物が原因であることが判明した。次に、成長促進細菌を分解細菌とともにウキクサ表層で共存させたところ、ウキクサ成長促進細菌がウキクサ表層を独占してしまい、エストロゲン分解細菌は淘汰されてしまうことが分かった。一方、成長促進物質を培地に添加することによってエストロゲン分解細菌の活性を維持したまま、ウキクサの成長速度を回復させることに成功した。以上の結果から、由来の異なる複数種類の細菌をウキクサ表層で共存させることの難しさと共に、成長促進物質添加効果の汎用性が示された。

平岡 聡史¹, 宮原 雅也¹, 藤井 和史¹, 町山 麻子^{2, 3}, 岩崎 渉^{1, 2, 3}¹東大・新領域, ²東大・理学系, ³東大・大海研

土壌や海洋に生息する微生物は、土煙や波飛沫と共に大気中に巻き上げられ、風によって高度数km上空の対流圏を流され、雨や重力によって地上に落下することで、海や大陸を越えて数千kmもの長距離を移動し得ると考えられている。大気中の微生物に関する研究は古くから行われており、植物やヒトの病原菌が長距離を伝搬する可能性が示唆されている他、比較的高温で大気中の水蒸気を氷結させる機能を持つINA微生物も大気中から検出されており、雲の生成や降雨の発生といった気象現象への微生物の寄与が示唆されている。そのため、このような微生物の長距離移動や病原菌の拡散、天候へ与える影響を解明する上で、雨水中の微生物を解析することは重要である。しかしながら、非培養ベースの手法による網羅的な細菌叢解析は、雨水中の微生物密度の低さや滅菌環境下での定常的なサンプリングの困難さのため、長期間に渡る観測は行われておらず、雨水微生物の由来環境や天候との関係は十分に分かっていなかった。本研究では、低微生物密度サンプルの実験解析手法の確立と1年以上に渡る雨水回収を行い、気象データとの統合的な解析から、雨水中の細菌類の菌叢解析や気象条件との関係性の探索、及び微生物の由来環境の推定を行った。雨水サンプルは2014年5月-2015年10月にかけて千葉県柏市及び東京都文京区の2箇所で行い、計26サンプルを対象に16S rRNA遺伝子のV5-V6領域の増幅とシーケンスを行った。また、気温、風速、雨量等の気象データや、HYSPLITモデルによる降雨開始直前240時間の気象移動軌跡データを利用し、細菌叢との関係性を解析した。雨水からはProteobacteriaやFirmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteriaが検出され、複数の病原菌やINA微生物を含む属も検出された。また気象条件との相関分析から、Bacteroidalesの相対存在量が地上気温と有意に逆相関することが示された。さらに、高度2000 mの上空大気の移動経路と細菌叢の推定由来環境との関係性を解析したところ、冬季にユーラシア大陸側から大気が移動してくる場合には土壌や動物由来の細菌が多く、逆に夏季に太平洋側から大気をもたらされた際は海洋由来の細菌が多いことが示唆された。継続的なサンプリングから、気象条件に依存して雨水細菌叢の由来環境が変化していることを示す。

外丸 裕司¹, 木村 圭², 山口 晴生³¹水産機構・瀬水研, ²佐賀大・低平地沿岸セ, ³高知大・農

海洋の重要一次生産者である珪藻は、種の存続のために増殖・繁茂しなくてはならないが、現場では常にウイルス感染による減耗の危険にさらされている。とりわけ巨大な現存量を誇る珪藻は、ウイルスにとって格好の宿主となるため、ウイルス感染に伴う減耗も引き起こされやすいと考えられてきた。一方、我々の研究グループでは現場調査により、珪藻はウイルス存在下においてもブルームを長期間維持可能であることを明らかにした。この一見矛盾する関係は、珪藻がウイルスと緩やかに共存可能であることを示唆する。本件に関連し、無菌バッチ培養試験では、活発に分裂している珪藻個体群にウイルスを接種しても、当該個体群は増殖し続け、分裂が緩やかになる定常期に移行すると一気に死滅していくという現象が観察されている。このことから、珪藻の分裂とウイルス感染には密接な関係があるものと推察される。そこで演者らは「活発に分裂している珪藻ほどウイルス感染による死亡が起こりにくい」という仮説を立て、これを検証すべく「分裂速度の異なる珪藻 vs. ウイルス感染」の半連続培養実験を行った。実験には、海産珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* ならびに本種感染性RNAウイルスCtenRNAV type-IIを用いた。本珪藻の一日あたりの分裂回数が1, 3, 5回になるように、半連続培養の希釈率を50%, 88%, 97%に設定した3つの系を用意し、培養が安定した日(0日目)から毎日、ウイルスを最終感染単位 10^7 /mlになるように接種した(+V区)。対照としてウイルス非接種区(-V区)を設けた。+V区の実験開始5日目までの個体群死滅率は、希釈率50%, 88%, 97%の培養系において、それぞれ84%, 15%, 7%となり、希釈率が高いほど低くなった。この結果は、仮説を概ね支持するものと思われた。ところが、培養5-7日以降、希釈率88%・97%の培養系においては、細胞数の減少が停止し、ウイルス存在下にもかかわらず対照区の半分程度の細胞密度が維持され続けた。さらに、希釈率50%の+V区においては接種前の細胞密度(約 3×10^6 cells/ml)が4-5日目に 10^2 cells/mlまで減少したものの、その後、再び 10^6 オーダーまで細胞密度が回復し、希釈率50%かつウイルス常在下という条件でその細胞数を維持した。本実験で、珪藻とウイルスが平衡的に共存する状態があるという事実が明らかになったことから、本種は分裂速度には依存しないウイルス抵抗性も持っているものと推察された。

藤原 沙耶¹, 早乙女 梢², 遠藤 直樹², 前川 二太郎², 中桐 昭²¹鳥取大・院農, ²鳥取大・農

好砂海生菌とは、海浜の砂の中を棲みかとし、流木や海藻等を分解して生活する海生菌類で、沿岸生態系での分解者の一員とされている。鳥取県沿岸では、1980年に2属2種の海生菌が報告(土倉, 1980)されて以来未調査であった。そこで、本研究では、鳥取砂丘海岸に生息する海生菌の菌類相を明らかにし、基質分解能・基質嗜好性の解明及び生長/生殖の特性・生活史・季節による消長の調査により、自然界での生態的役割を解明することを目指した。2015年4月～2017年8月に鳥取砂丘海浜で海泡を毎月採取し[海泡法]、含まれる胞子を単孢子分離し、分離株を得て同定した。分離株を海水澱粉寒天培地に移植し、10～35℃で生育温度試験を行った。また、分離株を滅菌バルサ材+海砂に移植し、20℃及び30℃で子実体形成を誘導した[バルサ材培養]。次に、海浜(前・中・後浜)の三地点で海砂+基質(材・アシ・海藻・羽毛)を採取し、ポリ袋で密閉培養を行い[海砂法]、砂粒上に形成された子嚢果・子嚢胞子を定期的に観察・同定した。分離した21種の菌株を各基質及び重油中の炭素源を唯一含むツアベック・ドックス培地計8種類に移植し、資化性を比較した。海泡法での胞子の消長から、出現菌は通年・温暖・寒冷期に孢子形成する菌種に類別でき、6・7月を境に菌類相に変化が見られた。培養性状で見ると、通年型の種は、10～35℃と広域で菌糸生長を示し、分生子形成は15～30℃と幅広い温度域で見られるが至適温度は20～25℃、子嚢果の形成と成熟は20℃の方が30℃より2～3か月早まる傾向があった。これらのことから、子嚢果・子嚢胞子形成は分生子形成より限定された温度域で、そして、種により期間は異なるが、培養後1～7か月と時間をかけて行われることが分かった。一方、温暖型は主にアナモルフ種で、菌糸生長は10～15℃の低温で弱く、分生子形成温度は20～35℃、至適温度は25～30℃であった。また、寒冷型の種は、菌糸生長は35℃では見られず、10～15℃の低温で良好であった。また、各菌種の海砂法での出現率が高い天然基質に含まれる炭素源と、資化性試験で生育が良好な培地の炭素源が一致する傾向が明らかになった。このことから、種ごとに炭素源の利用能が異なることで基質嗜好性にばらつきが生まれ、海浜の種の生息域が多様化し、季節による基質の種類や量の変化も、温度の変化とともに、菌類相や孢子数の変動に影響するものと考えられた。

北林 慶子, 都野 展子
金沢大学・自然科学研究科

キノコは様々な毒や匂いを生産するが、その生態学的意義は明らかにされていない。植物は匂いを利用して送粉者や捕食者を誘引・忌避させており、同様に菌類の“花”であるキノコも、動物散布や被食防御に匂いを利用していると考えられる。実際にマツタケには、摂食した胞子を破壊し、胞子散布能力の無いトビムシが少なく、マツタケの揮発性物質がトビムシに忌避作用を示すことが報告されている (Sawahata et al. 2008)。また、キノコは幼菌・成菌・老菌に生育段階が分かれ、その間のキノコの匂いも経時的に変化している。実際、キノコを訪れる菌食性動物相は菌種や生育段階によって異なっており、変化する匂いが動物相に影響している可能性がある。しかし、これまで生育段階ごとのキノコの匂いと菌食性動物の反応について、研究例はほとんどない。そこで本研究は、キノコの匂いを利用した生存戦略を明らかにすることを目的とし、菌食性動物のヤマナメクジを用いて、1) 菌種ごとの摂食行動の観察、2) 忌避された菌種の揮発性物質の分析、3) 候補物質を用いたバイオアッセイを行った。金沢大学角間キャンパスでヤマナメクジを採集し、3日以上絶食させた後、バット上に採集したキノコとヤマナメクジを5匹ずつ、15cm離して置き、15分間摂食行動を観察した。合計29種のキノコで観察した結果、ヤマナメクジは花のような香りのするアケボノドクツルタケと、薬品臭のするニセクロハツ（類似種）の2種を摂食せず、忌避反応を示した。また、アケボノドクツルタケのすべての生育段階において忌避反応を示した。続いて、アケボノドクツルタケの匂い成分をGCMS分析で分析した結果、ヤマナメクジが忌避しうる揮発性物質の候補を3種類検出した。3種の各試薬を0.1 μ /mLに調節してバイオアッセイした結果、ヤマナメクジは物質単独では反応がなかったが、複数種の物質を混合したものに対して、忌避反応を示した。これらの結果から、ヤマナメクジはアケボノドクツルタケが生産する揮発性物質を忌避していることがわかった。ヤマナメクジはアケボノドクツルタケにとって、負の影響を与える捕食者であれば、アケボノドクツルタケは匂いを利用して被食を防御していると考えられる。引き続き、ヤマナメクジにアケボノドクツルタケを強制的に摂食させ、排泄された胞子の形態観察と発芽実験を行う予定である。

武藤 清明¹, 神川 龍馬^{1, 2}, 西川 完途¹, 宮下 英明^{1, 2}¹京都大・院人環, ²京都大・院地環

一部の両生類の卵には、卵を包む透明なゼリー層内部に単細胞緑藻が共生して緑色を呈するものがあることが知られている。北米での研究では、両生類の卵には緑藻綱オオヒゲマワリ目 *Oophila* クレードに帰属する緑藻が単独で特異的に優勢していることが明らかにされている。また、我々もすでに日本固有種であるクロサンショウウオの卵に *Oophila* クレードに帰属する緑藻が共生することを明らかにしている。最近我々は、これまでに藻類が共生することが知られていなかったキタサンショウウオ、エゾサンショウウオ、エゾアカガエル、ニホンアカガエルの卵のなかに緑色を呈するものがあることを見いだした。本研究は、これらの両生類の卵に共生する藻類の群集構造解析および同定を目的に、顕微鏡観察、PCR-DGGEおよび分子系統解析を行った。

顕微鏡観察の結果、4種の両生類の卵のゼリー層内部には、いずれも球形の単細胞緑藻が優勢して共生していることが観察された。18S rRNA遺伝子の部分配列を利用したPCR-DGGEおよび分離断片の配列解析では、4種の両生類のゼリー層内部に優勢する緑藻は、互いに99.8%以上の相同性を示した。また、これらの配列を基に特異的プライマーを設計し、18S rRNA遺伝子配列のほぼ全長(約1600塩基)を決定し分子系統解析を行ったところ、これらの緑藻はオオヒゲマワリ目内に *Oophila* クレードとは異なる分子系統位置に単系統群を形成した。さらに、一部の種の卵のゼリー層内部には、今回発見された緑藻だけでなく *Oophila* クレードの緑藻も共に検出された。

本研究の結果は、両生類の卵のゼリー層内部に優勢し共生関係を成立させることのできる藻類が、*Oophila* クレードの緑藻とは限らないことを示した初めての例である。同時に、日本の両生類には、*Oophila* クレードの緑藻とは異なる緑藻と共生関係を成立させているものが存在することを示す。また、実験に使用した両生類の卵が、北海道、本州、九州において採取されたものであることから、本研究において両生類の卵に共生する藻類として見いだされたこの緑藻は、日本に各地に分布し、宿主特異性に低いことも明らかになった。さらに1つの卵塊に共生する藻類が必ずしも単一種でないケースが存在することも明らかとなった。

佐藤 大樹¹, 出川 洋介²¹森林総合研究所, ²筑波大学山岳科学センター菅平

ハルペラ目菌は、水生昆虫等、節足動物の消化管に付着生活する糸状菌の一群である。世界から200種以上が知られるが日本産はわずか17種に過ぎない。本邦の本目菌の多様性解明のためには、まず1地域の種の網羅的な探索が妥当と考え筑波山で調査を進めている。2011年より宿主の採集と解剖観察を行い、以下の3未記載種を認めた。1. *Lancisporomyces* sp. (宿主：オナシカワゲラ科昆虫)。菌体は主軸と密に分岐した叢状の菌糸からなり、菌体の基部および側部で後腸壁に付着。分枝した菌体の先端に3から10個以上のトリコスポア(以下孢子)を形成する。孢子は長楕円形で中央部が膨らみ(約34×6μm)、2本の付属糸を伴う。接合孢子は槍形で長さは160μmに達し、基部は4.5μm、先端付近が8μmの最大幅を持つ。本種は、接合孢子柄の形態から同属の5既知種のうち4種とは区別され、残りの1種とは接合孢子の長さが異なるため、未記載種と判断された。

2. *Stachylinia* sp. (宿主：アミカ科昆虫)。菌体は分枝せず、最大580μm×13μm、先細りした基部細胞で中腸壁に付着。孢子は中心がやや太い長円形で、36.8×8.7μm、襟構造を欠き、1本の付属糸を伴い、最大70個以上形成される。接合孢子は未発見。本属で菌体が400μmを超える3種はユスリカ科を宿主とし、孢子サイズがいずれの既知種とも異なるため未記載種と判断した。アミカ科は本目の宿主として初記録となる。3. *Zygopolaris* 属類縁属の未記載種。(宿主：シロハラコカゲロウ)。5月に採集。菌体は最長1mmを超え、先端は肛門から体外に突出する。球状の基部細胞で後腸壁に付着し、付着部の腸壁は陥入する。孢子は円筒形、57×4.5μm、襟構造と付属糸を欠く。接合孢子は紡錘形、40×9μm、2本の付属糸を伴い、中心部を外れた位置で接合孢子柄に斜めに連結する。接合孢子柄は発達した接合菌糸より生じる。本菌は肛門から体外に突出して孢子を形成する点で*Zygopolaris*属に類似するが、同属の接合孢子は円錐形であるのに対し、本菌では紡錘形(双円錐形)である。接合孢子の形態は分類形質として重要な特徴であると考えられることから、新属の提案をする必要がある。筑波山で記録されたハルペラ目は7属7種となった。

西村 祐貴¹, 小田切 正人², 雪 真弘², 井上 潤一¹, 守屋 繁春², 大熊 盛也^{1, 2}
¹理研・BRC, ²理研・CSRS

シロアリの腸内では多種多様な細菌・古細菌・原生生物が混在する多重共生系が存在していることが知られており、その存在はシロアリの生存に必須である。しかしこの共生系内の微生物は大半が培養不可能であるため、個々の微生物種がどのような役割をもっているのかはほとんど明らかになっていない。そこで本研究ではイエシロアリの腸内に生息する3種の真核微生物 (*Pseudotriconympha grassii*, *Holomastigotoides mirabile*, *Spirotrichonympha leidy*) について、培養を介さずそれぞれのシングルセルからトランスクリプトームを取得することにより、その機能を明らかにすることを試みた。得られたデータから遺伝子配列とその発現量を推定し、3種間で発現遺伝子にどのような違いがあるのかを検討した。その結果、*S. leidy*においてのみキチン分解酵素(キチナーゼ)遺伝子の発現量が非常に高いことが判明した。キチナーゼに加えて、*S. leidy*のみがキチン分解産物からアンモニアとフルクトース6リン酸にまで分解する遺伝子を有しており、キチンからATPやアミノ酸を合成できることが予測された。これらの遺伝子が*S. leidy*の細胞内で転写されていることは、*in situ*ハイブリダイゼーションによって確認された。そこでシロアリの後腸から真核微生物3種が混在する画分と、*H. mirabile*及び*S. leidy*の2種のみが存在する画分に分離した。それぞれの画分からタンパク質を粗抽出してキチナーゼ活性を測定したところ、後者の方が有意に活性が高かった。これらのことから、イエシロアリ腸内では*S. leidy*が主体的にキチンの分解を行っていると言える。*S. leidy*は宿主が脱皮した後に摂食した体表やグルーミング等によって取り込まれた菌類を分解することで、効率的な窒素源の利用や菌類感染からの防衛に貢献していると考えられる。また興味深いことに、*S. leidy*でキチン分解に関与する遺伝子群はそれぞれ起源が異なり、菌類や細菌からの水平伝播に由来することが分子系統解析によって示唆された。シロアリ腸内という特殊な環境下でニッチを確立するために、共生原生生物は複雑な遺伝子進化を遂げる必要があったと考えられるが、本研究によりその一端が明らかにされた。

菊池 義智¹, 竹下 和貴^{1, 2}, 松浦 優², 孟 憲英¹, 新里 尚也², 三谷 恭雄¹¹産総研・生物プロセス, ²琉球大・熱生研

多くの昆虫が体内の共生微生物と緊密な相互作用を行っているが、そのような共生関係の分子基盤やその進化プロセスにはいまだ不明な点が多い。とりわけ昆虫における「細胞内共生」の進化は大いなる謎である。多くの細胞内共生細菌が系統的に腸内細菌科に属することから、細胞内共生の起源は腸内共生（細胞外共生）にあるとも言われるが、その進化プロセスについてはほとんど分かっていないのが現状である。そして、カメムシはその謎を解明するための鍵を握っている。ホソヘリカメムシや多くのナガカメムシ類は土壌細菌であるBurkholderiaと緊密な共生関係を構築している。これらカメムシの消化管には盲嚢と呼ばれる袋状組織が多数発達しており、その内腔中にBurkholderia属細菌が特異的に共生している。これら共生細菌は宿主カメムシの成長や生存に重要な役割を果たしているが、母から子供へと垂直伝播することではなく、毎世代環境土壌中から獲得される。最近我々はコバネヒョウタンナガカメムシをはじめとしたヒョウタンナガカメムシ類の調査を行い、他のカメムシ類と同様にBurkholderia共生細菌を毎世代環境中より獲得し盲嚢に保持することを明らかにした。さらなる飼育実験により、共生細菌の適応度効果を調査したところ非感染個体は成虫になることなく全て死亡し、必須共生であることが明らかとなった。さらに、詳細な電子顕微鏡観察を行ったところ、共生細菌は盲嚢の内腔だけでなくその上皮細胞内にも侵入し細胞内共生していることが明らかとなった。昆虫において必須共生細菌を環境中から毎世代獲得し細胞内に保持する例はこれまで報告がなく、ナガカメムシ類は初の例と言える。この共生系は腸内共生から細胞内共生への進化をつなぐミッシングリンクともいえ、Burkholderia共生細菌が培養可能で遺伝子組み換えも容易であることを考えると、ナガカメムシ類の共生系はこれまでアプローチ困難だった細胞内共生の分子基盤・進化原理をひも解くための大きなモデル系になると期待できる。

石川 和樹¹, 吉田 陽菜花¹, 武田 尚¹, 若菜 大悟¹, 東條 元昭², 佐藤 文彦³, 細江 智夫¹
¹星薬大, ²大阪府大, ³京大院生命・統合生命

当研究室では、植物二次代謝産物であるベルベリン（BBR）を資化できる細菌*Rhodococcus* sp. BD7100株の機能解析を目的とした研究を行っている。本菌株によるBBR分解能の基質特異性を評価するために、オウレン熱水抽出エキスに含まれる5種類のBBR類縁体（palmatine, coptisine, jatrorrhizine, epiberberine, columbamine）に着目した。BD7100株を、オウレンエキス添加培地で培養し、各類縁体の分解挙動を解析した。その結果、BBR, coptisineおよびjatrorrhizineは速やかに分解されたが、一部BBR類縁体の分解反応が培養36時間以降で停止し、同時にBD7100株の生菌数の減少も観察された。そこで、培養液のBD7100株に対する抗菌活性を経時的に測定した結果、培養36および48時間の培養液にBD7100株に対する抗菌活性が認められた。これらの結果から、BD7100株は、オウレンエキス添加培地で培養すると、本菌株に対する抗菌物質を産生することが推測された。そこで、本研究では、BD7100株のオウレンエキス添加培養により産生する抗菌物質の特定を目的とした検討を行った。BD7100株をオウレンエキス添加培地で48時間培養し、各種有機溶媒を用いて脱塩・分画を行った。さらに、BD7100株に対する抗菌活性を指標に各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製した結果、新規ベンゾキノン誘導体 $\mathbf{1}$ を単離した。化合物 $\mathbf{1}$ は、高分解能ESI-MSより分子式を $C_{12}H_{14}O_6S$ と決定し、さらに各種NMRを用いた詳細な解析により構造を決定した。化合物 $\mathbf{1}$ は、その構造からBBR誘導体の分解産物と推測しているが、詳細な生成経路については現在検討中である。化合物 $\mathbf{1}$ は、ペーパーディスク法でBD7100株に対してカナマイシンおよびアンピシリンと同等の抗菌活性を示した。さらに、 $\mathbf{1}$ を含むクロロホルム層を用いて各種微生物に対する抗菌活性試験を行った。その結果、グラム染色陽性細菌、真菌および卵菌のいくつかの種に対して抗菌活性が観察された。

新井 沙和, 菅野 菜々子, 松浦 克美, 春田 伸
首都大院・生命科学

土壌をはじめとして自然環境中では、細菌の増殖にとっての栄養源が常に供給されているわけではなく、細菌はしばしば飢餓状態にさらされる。飢餓状態の細菌では、細胞サイズやストレス抵抗性などの変化が観察されている。飢餓時の生存性維持には細胞エネルギーが必要であると考えられているが、飢餓応答変化への細胞エネルギーの必要性は知られていない。本研究では紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* を用いて、炭素飢餓応答に対する細胞内エネルギー量の影響を細胞サイズ・塩ストレス抵抗性の視点から明らかにした。*R. palustris* を炭素源制限培地を用いて嫌気・明条件で培養し、炭素枯渇による増殖の停止を確認した。増殖が停止した細胞を嫌気・明、嫌気・暗、または好気・暗条件下で1日間置き、3種類の飢餓細胞を得た。これら飢餓細胞および増殖期の細胞について、細胞内ATP量、塩ストレス抵抗性、細胞長を比較した。塩ストレス抵抗性は2.5 M NaCl、暗所1時間暴露後のコロニー形成数を生存率(%)として評価した。細胞内ATP量は、嫌気・暗飢餓条件では増殖停止から約2分の1に減少しており、生存性維持に消費されたと考えられた。一方、嫌気・明条件では、2倍以上に増加した。嫌気・暗飢餓細胞の塩ストレス後の生存率は $16.1 \pm 9.7\%$ であり、増殖細胞($11.3 \pm 7.4\%$)と同様に低かったが、嫌気・明飢餓細胞では $79.7 \pm 23.1\%$ まで上昇した。好気・暗条件においた飢餓細胞では、ATP量の低下は見られず、塩ストレス耐性は $98.1 \pm 31\%$ まで上昇していた。ストレス耐性の上昇が観察された嫌気・明飢餓細胞および好気・暗飢餓細胞では、細胞サイズの顕著な減少も見られた。*R. palustris* において、飢餓に誘導される塩ストレス抵抗性の上昇と細胞サイズの減少が、炭素源飢餓1日で確認された。ただし、この飢餓応答変化は、光照射もしくは好気条件のみで見られた。これらの細胞ではATP量が高く、光合成や細胞内物質を基質とした酸素呼吸によりエネルギー産生があったと考えられる。飢餓応答変化は、細胞構成成分および細胞膜の分解・再合成などを伴うと考えられ、これらの代謝にエネルギーが必要であったと強く示唆された。

XIAO DENG¹, Hashimoto Kazuhiro², Akihito Okamoto³¹東京大・院応化, ²物材研, ³物材研・GREEN

Sulfate reducing bacteria (SRB) are ubiquitous in marine sediments depleted for the energy source of organics (B. B. Jorgensen et al. 2016). In such environments, H₂ formed from water radiolysis, or water rock interactions has been considered as the main energy source, yet remained unclear to be sufficient to support the subsurface ecosystems or not. Recent findings showed several strains of sedimentary SRB can harvest energy from solid-state electron donors via extracellular electron uptake (H. T. Dinh et al. 2004, X. Deng et al. 2015). Here, we conducted whole-genome analysis of *Desulfovibrio ferrophilus* IS5, and identified a gene cluster coding for outer membrane cytochromes (OMCs), which potentially mediate electron transfer across OM with multiple redox-active heme centers. As the gene expression of the OMCs are unregulated under organic-depleted condition, electron uptake by IS5 is suggested to be mediated by the identified OMCs. We will discuss our bioinformatical analysis results in more detail, and show experimental evidence of extracellular electron uptake by IS5 via OMCs, such as *in vivo* analysis of OMCs expression condition, and whole-cell electrochemical measurements.

遊泳性の微細藻類であるユーグレナ（和名ミドリムシ）の群れをマイクロ流路内に閉じ込め、光刺激や化学刺激によって動きを制御する研究を行っている[1]。これまでに、強い光に対する光忌避応答の時間変遷[2,3]や、CO₂ガスに対する化学走性の濃度依存性を調べてきた[4]。今回は、光の勾配とCO₂ガスの濃度勾配が重複している環境に対する忌避応答の様子を調べた。

直径2.5mmで深さ150umの2次元マイクロチャンバーにユーグレナを数十から数百匹閉じ込め、プロジェクターを利用した光パターンの動的な照射によって光忌避応答を誘起する。また、マイクロチャンバーに沿ったバイパス流路にCO₂ガスを流して化学刺激を与える。光強度の勾配とCO₂ガス濃度の勾配を重複させてユーグレナのセル分布と動きを遊泳軌跡として追跡する。本実験において、光忌避応答はphoto-taxisではなく光驚動応答である。光強度勾配に対するユーグレナのセルの分布は比較的なだらかな傾斜となった。それに対してCO₂濃度勾配に対してはセルは極端に低濃度側に偏った分布を示した。このことより、ユーグレナはCO₂に対する化学走性の方が光忌避応答より強く作用していると考えられた。光強度勾配とCO₂濃度勾配を逆方向に重畳させると、CO₂勾配単独の時よりは偏りが弱くなったものの、やはりCO₂濃度勾配が支配的に作用していた。光驚動応答と比べると、化学走性は方向性があるためより生存に必要な応答であると考えられる。[1] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 11 (2011) 1933-1940.[2] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Maeda, Plant Cell Physiol., 55 (2014) 1704-1712.[3] K.Ozasa, J.Won, S.Song, S.Tamaki, T.Ishikawa, M.Maeda, PLoS ONE, 12 (2017) e0172813.[4] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 13 (2013) 4033-4039.

佐野 翔平¹, 多羅尾 光徳²¹東京農工大学・農学部・環境資源科学科, ²東京農工大学大学院・農学研究院

【はじめに】

従属栄養性の原生生物は微生物ループにおける結節点の役割を担っている。したがって、従属栄養性の原生生物の増殖や生残に及ぼす環境要因を理解することは微生物ループを通じた物質循環を理解するうえで重要である。これまで、温度、pH、浸透圧などの環境要因が検討されてきたが、光の影響に注目した例はきわめて限られている。我々は過去に、従属栄養細菌の増殖、基質利用速度、呼吸活性が光照射下において抑制されることを明らかにしている。そこで本研究では、従属栄養性の原生動物も光照射下において増殖が抑制されるのではないかと仮説を立て、これを検証する実験を行った。

【試料と方法】

モデル原生動物として、無菌のセン毛虫 *Tetrahymena thermophila* を用いた。無菌の *T. thermophila* 酵母エキス、ペプトン、グルコースをそれぞれ0.3, 0.15, 0.15 (単位, g L⁻¹) 含む培地に約2×10² cells mL⁻¹ となるように接種し、暗所 (D区) または照度11 klm m⁻² の可視光照射下 (L区) にて15°Cで培養した。8日間の培養期間中、経時的に *T. thermophila* の細胞数を測定した。培養液をホルムアルデヒドで固定 (終濃度2%) し、メチレンブルーで染色した後、Sedgewick-Rafter計算盤上の *T. thermophila* を実体顕微鏡にて計数した。

【結果と考察】

対数増殖期における *T. thermophila* の比増殖速度 (day⁻¹) は、L区で1.2±0.1, D区で2.0±0.3であり有意な差が見られた (p<0.01)。定常期に入ったと思われる培養8日目の細胞数密度 (cells mL⁻¹) は、L区で2~4×10², D区で4~6×10⁴ であり有意な差が見られた (p<0.001)。これらの結果より、可視光照射により *T. thermophila* の増殖が抑制されたと考えられる。現在、可視光照射が細胞サイズに及ぼす影響や、細菌を基質とした場合の可視光照射の影響について検討を行っている。

埋橋 志穂美, 田中 大介, 青木 孝之, 中島 比呂美, 山崎 幸
農研機構・遺伝資源センター

農研機構で実施しているジーンバンク事業の微生物部門では、保存微生物株のうち、大部分の糸状菌の凍結保存では、寒天培地上の菌体を打ち抜いて保護剤とともに凍結用チューブに格納し、プログラムフリーザーなどで冷却する保存法がマニュアル化され、効率的な保存・管理が行われている。一方、卵菌類においては、凍結保存が困難で死滅しやすい菌株が多く、保存株の安全確保のため、寒天斜面培地での継代培養が併用される状況にある。この方法では、定期的な移植作業に多大な労力とスペースを必要とするほか、継代培養の繰り返しによる、形態や生理学的性質の変異、汚染等の事故も懸念される。これら卵菌類の長期保存法を確立し、効率的かつ安定的な保存・管理体制を構築することが当事業で保存業務を遂行するために重要である。そこで本研究では、従来の方とらわれない新規超低温保存法の開発を目指している。この方法は、滅菌処理したアブラナ科種子へ卵菌類を侵入・定着させたのち、液体窒素で急速冷却処理を行うもので、そのための培養条件や凍結保護剤の組成、処理時間、あるいは昇温方法について検討を行ってきた。その結果、供試した*Pythium*属菌において、これまでほぼ0%に近い生残率であった菌株についても、50~80%以上、菌株によっては100%の生残率の達成が見られた。一方で、高生残率を得るための条件が菌株ごとに異なることが多く、超低温保存前に菌株ごとに詳細な条件検討をする必要性が懸念された。今後は、更に供試菌株数を増やして条件検討を行うとともに、超低温処理過程におけるメカニズム等も解明しながら、可能な限り汎用性の高い超低温保存法を確立し、ジーンバンク事業への活用を目指したい。

繁森 英幸¹, 松本 拓矩², 田辺 友佳², 竹上 尚子², 細矢 剛³, 供田 洋⁴¹筑波大・生命環境, ²筑波大・院生命環境, ³国立科博・植物研, ⁴北里大・院薬

【目的】真菌類から単離された生物活性物質は抗菌剤や抗癌剤として化学療法の革新的進歩に貢献してきた。真菌類は有用な医薬品リード化合物の探索源であるが、非土壌生で採集が困難な小型の子実体を形成する真菌類については生物活性物質の探索に用いられる機会は少なかった。そこで本研究では、非土壌生の子囊菌門盤菌類を有望な生物活性物質の探索源として着目した。抗菌活性試験を用いて種々の子囊菌類から選別した*Lachnum palmae*について、その培養抽出物からの新規生物活性物質の探索と構造解析を目的として研究を行った。【方法および結果】*L. palmae*をPYG培地（glucose 20 g/L, polypeptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, pH 7.5）で培養し、抗菌活性を指標にして各種クロマトグラフィーで分離・精製し、新規化合物を単離した。一方で、PYG培地にKCl 0.5 % またはKBr 0.5 % を加えた培地での培養も行い、同様に分離・精製して新たな化合物の単離も行った。得られた新規化合物について、NMR、MSならびにX線結晶解析を用いてそれらの構造を明らかにした。*L. palmae*培養菌体の抽出物からは、2種類の新規ジベンゾピロン化合物Palmaenone AおよびBを、上清部からは、2種類の新規シクロペンテノン化合物Palmaenone A およびBならびに3種類の新規シクロペンテノール化合物Palmaenol A およびBならびにPalmaetriolを単離した。一方で、KClやKBrを培地に添加した培養菌体からは、4種類の新規イソクマリン化合物Palmaerin A-Dを単離した。これらの新規化合物について抗菌活性試験を行った結果、Palmaenone A およびBに顕著な抗菌活性が認められ、その活性発現には共役ケトン基や塩素原子の存在が重要であることがわかった。【結論】*L. palmae*から顕著な抗菌活性を有する新規含ハロゲン化合物を見出した。一方で、本菌株にKClやKBrを添加することで、ハロゲン原子が分子構造に導入されることも明らかにした。このような小さな分子骨格に多数のハロゲン原子を有している化合物は稀であることから、*L. palmae*のような子囊菌門盤菌類は、新たな生物活性物質の探索源として期待される。

吉見 啓¹, 宮澤 拳², 佐野 元昭³, 古明地 敬介², 張 斯来², 五味 勝也², 阿部 敬悦^{1, 2}
¹東北大・未来科学, ²東北大・院農, ³金工大・バイオ

一般的に糸状菌を液体振盪培養すると菌糸が凝集し、菌糸の塊を形成しながら生育する。この菌糸凝集性は、糸状菌における高密度培養を困難にし、発酵生成物の生産を限定する要因と考えられてきた。我々は以前より、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において細胞壁 α -1,3-グルカン (AG) の機能解析を進めてきた (Yoshimi et al. 2013, PLOS ONE)。この過程において、AG欠損株を液体培養すると菌糸が培地中に均一分散することを見出した。すなわち、糸状菌において細胞壁AGは、菌糸の凝集性に関与することが明らかになった。また、AG欠損株を液体培養すると菌体量も増加したことから、これらの特性を利用すれば糸状菌における高密度培養が達成でき、物質生産性の向上が見込めるのではないかと考えられた。そこで本研究では、産業用糸状菌 (麹菌) *A. oryzae* においてAG欠損株を造成し、その培養性状が発酵生産に好適か否かを検証することを目的とした。まず、麹菌には3種のAG合成酵素 (AGS) をコードする遺伝子が存在するため、AGS遺伝子の3重破壊株を造成し培養性状を解析した。その結果、麹菌AGS遺伝子3重破壊株は、*A. nidulans* とは異なり菌糸は完全には分散せず、野生株に比べて小さな菌糸の塊を形成しながら生育した。また、3重破壊株は野生株と比較して菌体生育量が増加しており、細胞壁からAGが消失していることも確認された。次に、麹菌の野生株およびAG欠損株を親株とし、ポリエステル分解酵素であるクチナーゼ CutL1 をコードする遺伝子 (*cutL1*) を高発現する株を作製した。これらの *cutL1* 高発現株について、液体培養におけるタンパク質生産性を評価したところ、*cutL1* 高発現AG欠損株は、*cutL1* 高発現野生株と比較して菌体生育量、CutL1生産量とも上昇していることが明らかになった。これらの結果から、菌糸塊サイズの縮小に伴い菌糸塊の表面積が増大し、タンパク質生産性の向上に繋がったと考えられた (菌糸塊内部の嫌気細胞数の減少、呼吸によるエネルギー生産効率の向上)。一方、細胞壁からAGが消失したにも関わらず菌糸は完全分散しなかったことから、麹菌にはAGとは別の菌糸凝集因子が存在することが示唆された。現在、この菌糸凝集因子の探索・解析を進めており、その結果についても報告したい。

高松 進¹, Siska A.S. Siahaan¹, 坂本 人美², 篠田 俊哉²¹三重大・院生資, ²三重大・生資

DNAシーケンス解析によりカシ類うどんこ病菌 *Erysiphe gracilis* には種レベル以上に異なる4つのgenotypeが存在することが明らかになった。このgenotypeの分化に関係した要因を探るため、カシ類の分布域である茨城県以西の広い地域から合計401サンプルを採集し、PCR-RFLPによりgenotypeの分布頻度を調査した。その結果、genotypeの分布頻度に大きな地域間差は認められなかったが、シラカシからはgenotype IIのみが、ウラジロガシからはgenotype IVのみがそれぞれ検出された。また、genotype IとIIIはアラカシからのみ検出され、アラカシからはすべてのgenotypeが検出された。これらの結果は、genotypeの分化に宿主要因が強く関わっていることを示唆している。三重大学キャンパス内においてgenotype IとIIの検出頻度の時期的変動を探るため、キャンパス内の4箇所に定点を定め、1ヶ月に一度ずつ計312サンプルを採集してPCR-RFLP法によりgenotypeを同定した。その結果、genotypeに時期的変動は認められず、genotype IとIIは年間を通じて共存していると考えられた。genotype IとIIは同一葉上にもしばしば共存した。カシ類うどんこ病菌 *E. gracilis* と *Cystotheca wrightii* は1年で1ヶ月間しか分生子を形成せず、通常のうどんこ病菌とはかなり異なる生活環を持つことが分かった。このような特異な生活環はカシという宿主の生活環に適応的に進化したものと考えられた。

O-043

30年以上前に土壌より分離されたセルラーゼ生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticu* の再同定

星野 保^{1, 2, 3}, 藤井 達也¹, 井上 宏之¹, 矢野 伸一¹

¹産総研, ²広大院先端物質, ³筑波大院生命環境

30年以上前に土壌より分離されたセルラーゼ生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* の再同定 *Acremonium cellulolyticus* Y-94株 (CBS 136886, FERM BP-5826) は、土壌より山辺らによって分離され、1985年特許公報に「新種」として記載されたセルラーゼ生産糸状菌の「裸名」である。現在、産総研では本菌の生産する糖質加水分解酵素に関する多様な研究を実施している。

Y-94株の初期記載によれば、分生子柄は気生菌糸側面より突出し、無色。分生子は垂球形 ($2.5\text{-}5 \times 2\text{-}4.5\mu\text{m}$) で滑面、無色で、連鎖は非常にゆるく分散しやすいとされる (特許公報 昭60-43954)。しかし、本種の分生子形成能は非常に不安定で継代培養で容易に消滅すると推定され、後に分生子形成様式は enterothallic (栄養菌糸分節型) とされ、分生子は $2.4\text{-}2.6 \times 8.0\text{-}16.0\mu\text{m}$ と「新種記載」とは異なる記述がなされており、他の形態を含め *Sporendonema* 属に類似と報告された。

本種はゲノム解析の結果、*Taratomyces* 属に含まれることが明らかとなった。最近縁種である *T. pinophilus* NBRC 100533^T 株と比較し、Y-94株は滅菌稲わら懸濁液にて2日間培養後、菌叢を滅菌蒸留水に懸濁し、1週間程度培養を行うと、分生子柄・ステリグマの形成は見られないが、enterothallicな孢子形成が確認された。一方、*T. pinophilus* NBRC 100533^T 株では enterothallicな孢子形成に加えて、分生子柄・ステリグマの形成も見られた。また、CYA培地にて、本種菌叢の色素形成はほとんど確認できなかった。上記の結果を総合して、本種を *Taratomyces cellulolyticus* と提案した。

文献調査および関係者からの聞き取り調査により、*T. cellulolyticus* Y-94株の基準標本産地は、福島県須賀川市の水田と推定した。

服部 友香子¹, 中島 千晴², 本橋 慶一³¹東農大院・林学, ²三重大院・生資, ³東農大・開発

ヒノキ科樹木に寄生する*Phyllosticta*属菌は、北米でクロベ属に寄生する*Phy. thujae*, ビャクシン属およびヒノキ属への寄生する*Phy. spinarum*が報告されている。我が国においては、ヒノキ属およびアスナロ属に寄生する*Phoma pilospora*とそのシノニムと考えられる*Pho. thujopsidis*が、*Phyllosticta*属菌に転属すべき種として明らかとされているほか、スギ属に寄生する*Phy. cryptomeriae*, スギこぶ病菌*Phyllosticta* sp., 内生菌として*Phy. capitalensis*の4種が報告されている。演者らは、ヒノキ科5属の樹木に寄生する日本産*Phyllosticta*属菌の分子系統解析から、ヒノキ科に寄生する*Phyllosticta*属菌は、多系統であり、それぞれが複数の宿主属に寄生する可能性があることを明らかにした。しかしながら、それらの系統群と既知種との関連性については未検討で、国内におけるヒノキ科由来の*Phyllosticta*属菌についても分類学的再検討が必要である。そこで本研究では、ヒノキ科樹木に寄生する日本産*Phyllosticta*属菌と海外で報告されている既知種との関連性を明らかにすること、ヒノキ科由来の日本産*Phyllosticta*属菌の分類学的再検討を目的として、ヒノキ科樹木9属から分離された*Phyllosticta*属菌の複数遺伝子領域による分子系統解析、形態的特徴の精査を行った。その結果、推定された系統樹から、スギ属を除く旧スギ科のセコイア属およびメタセコイア属は、いずれも*Phy. capitalensis*に寄生され、アスナロ属は3系統、クロベ属およびビャクシン属は2系統の*Phyllosticta*属菌に寄生されていた。一方で、これらの*Phyllosticta*属菌は、旧ヒノキ科4属を宿主とする系統群、スギ属を宿主とする系統、マツ科2属と旧ヒノキ科3属を宿主とする系統、*Phy. capitalensis*から成る4系統群に位置することが明らかとなった。しかしながら、推定された系統群内では形態的特徴は必ずしも一致せず、系統群内には、複数種が存在している可能性が高い。また、クロベ属から分離された*Phyllosticta*属菌の一種は、分生子および付属糸の形状から*Phy. thujae*と同定された。同じくクロベ属から分離された菌のうち、マツ科2属と同一クレードを形成する*Phyllosticta*属菌は、マツ目内の複数属を宿主とする未記載種であると考えられた。以上の結果から、我が国のヒノキ科樹木から日本新産種*Phy. thujae*のほか、複数の未記載種が存在することが明らかとなった。

橋本 陽^{1,2}, 高橋 勇人¹, 平山 和幸³, 田中 和明¹¹弘前大農生, ²学振特別研究員P D, ³青森産技りんご研

Lophiostoma bipolare (以下Lb) は、淡水生で子嚢の両端に突出型付属物をもつことで特徴付けられ、汎世界的に分布すると考えられている。演者らはLb 類似菌31 菌株についてnrDNA LSU, ITS 領域に基づく分子系統解析および形態観察を行い、本種には子嚢の微細な違いで区別できる11種の類似菌が存在することを報告した(高橋ら 2016, 日本菌学会大60回大会)。しかし、*Lophiostoma* 属については複数遺伝子に基づく系統解析および子嚢の微細構造を重視し16属に分割する提案がなされており、これら類似菌の各種がいずれかの属に所属するのか、もしくは既知のいずれの属にも所属しないのかは明確にできていなかった。そこで本報告では、広義Lb についてさらにnrDNA SSU, β -*tublin*, *tef1*, *rpb2* の配列を決定し分子系統解析を行うとともに、属分類の指標とされている子嚢の形態を観察した。なお、*Lophiostoma* 関連属の子嚢の微細構造は基質によって可変的であり、属レベルの分類形質に不向きであるとする意見もあるため、天然標本と培養下の子嚢を観察することでその安定性も評価した。結果として、広義Lb には*Pseudolophiostoma* 属と*Vaginatispora* 属に所属する種が存在するとともに、本科のいずれの属とも一致しない6新属に所属する種で構成されていることが明らかとなった。狭義Lb は狭義*Lophiostoma* 属と系統的に異なり、*Vaginatispora* 属と姉妹関係にあるが、本種は子嚢の孔口周辺に楕状子座を形成する点で、新属に収容すべきであると考えられた。その他の種で構成される5新属にも子嚢の微細構造は属ごとに共通していることが示唆された。いずれの種においても培養下で形成された子嚢は天然標本のものよりも殻壁が厚くなる傾向があるものの、解剖学的特徴は変わらないことを確認できた。すなわち、*Lophiostoma* 関連属において子嚢の微細構造の特徴は、従来考えられていたよりも安定した分類形質であり、属レベルの系統推定に有用な指標となりうることが考えられた。複数の遺伝子領域を解析した結果、今回の新属も含めた*Lophiostoma* 関連属において、ITS 領域がDNAマーカーとして有効であった。今後、広義Lb を正確に同定するためには、子嚢の形態形質を重視するだけでなく子嚢の解剖学的特徴も検討するとともに、ITS 領域の配列に基づく系統的な裏付けが必要であると考えられた。

高橋 拓雅¹, 橋本 陽^{1, 2}, 平山 和幸³, 田中 和明¹¹弘前大・農生, ²学振特別研究員PD, ³青森産技りんご研

Massariosphaeria typhicola (*Leptosphaeria typhicola*) は1873年にフィンランドのガマから記載された子のう菌類（クロイボタケ綱・プレオスポラ目）の1種である。淡水中、海水中、陸上の、草本・木本植物に腐生的に生じ、欧州や北米、アジアなど世界中から報告されていることから、普遍種であると考えられている。一方で、子のう胞子形態と塩基配列に多様性が認められることから、種複合体であることも示唆されている（高橋・田中 2016, 日本菌学会第60回大会）。さらに本種と同定された菌株には、Amniculicola 科とLindgomyces 科に所属するものが知られているものの (Zhang et al. 2009), 狭義*M. typhicola* の系統学的位置は明確になっていない。本研究では、広義*M. typhicola* の22菌株について、18S, 28S, ITS nrDNA, *tef1*, *rpb2* に基づく分子系統解析と詳細な形態観察を行うことで、狭義*M. typhicola* の系統を把握するとともに、種構成について再検討することを試みた。結果として、本菌群には少なくとも4属が存在し、これらは2属がLindgomyces 科, 1属が Amniculicola 科, 1属が Lentithecium 科に所属することを確認した。これらのうち、有性世代の形態的特徴から、Lindgomyces 科に所属する1属に狭義 *M. typhicola* が位置する可能性が高いと考えられた。Lindgomyces 科に位置する2属は、子のう胞子の縦横比の違いや無性世代の形成の有無等により、少なくとも計6種からなることが示唆された。そのほか、Amniculicola 科および Lentithecium 科に所属する系統でそれぞれ1属1種が認められた。以上のことから、従来 *M. typhicola* と同定されてきた菌株は、少なくとも3科にまたがる、4属8種からなることが示された。今後は、本研究により見いだされた狭義 *M. typhicola* に相当すると思われる菌について、エピタイプ指定を試みるとともに、この系統からそれる3属7種についても分類学的な処理が必要になると考えられる。

荒山 恭誠¹, 橋本 陽^{1, 2}, 田中 和明¹¹弘前大・農生, ²学振特別研究員PD

*Teichospora*属はクロイボタケ綱, プレオスポラ目, テイコスポラ科に所属する子の菌類である。本菌群については, 9ないし10属に細分する考え (Thambugala et al. 2015; Wijayawardene et al. 2016) と, 1属として広く定義付ける考え (Jaklitsch et al. 2016) が, テレオモルフ形態の比較と分子系統解析から提案されているが, これらのいずれが妥当であるかについては明確になっていない。そこで本研究では, 広義 *Teichospora* 属の新たに採集した30菌株とこれまで報告されてきた49菌株について18S, 28S, ITS nrDNA, TEF, RPB2の塩基配列に基づく分子系統解析を行った。さらに, テレオモルフの形態に加え, 従来ほとんど検討されていなかったアナモルフの形態についても比較することで, 広義 *Teichospora* 属の分類学的再検討を試みた。

その結果, これまで本菌群に広く知られていたphoma型/coniothylium型 (無色または有色の単細胞分生子) に加え, floricola型 (有色・多細胞で縦溝のある分生子), paulkirkia型 (有色・2細胞で粗面の分生子), phlyctema型 (糸状分生子) など様々なアナモルフ形態の菌が広義 *Teichospora* 属内に所属することを確認した。このことから広義 *Teichospora* 属は単一属ではなく複数属へ分割すべきであり, 少なくとも3新属を含む13属を本菌群に認めるべきと考えられた。これまで本菌群はテレオモルフ形態を基に属レベルの分類が議論されてきたが, アナモルフの形態も属を区別する上で重要な指標となることが明らかとなるとともに, 子のう果や子のう胞子に見られる形態的差異 (孔口部の色, 頸部の長さ, 子のう胞子の細胞数など) は有用な分類形質であることが本研究により再確認された。

松村 美里^{1, 2}, 加藤 航¹, 橋本 陽^{1, 3}, 高橋 由紀子⁴, 白水 貴⁵, 田中 和明^{1, 2}¹弘大, ²岩手連大, ³学振特別研究員PD, ⁴森林総研, ⁵三重大

日本産ブナの寄生菌類を採集調査する過程で、*Asteromassaria* 属菌と形態的に類似した菌を得た。*Asteromassaria* 属の基準種である *A. macrospora* はヨーロッパブナに寄生し、殻壁の厚い大型の子のう果と、紡錘形、褐色、1–3隔壁の子のう胞子を持ち、三日月形、褐色の scoliosporium 型無性世代を形成することで特徴付けられ、クロイボタケ綱・プレオスポラ目・プレオマッサリア科に所属する。本研究で得られた日本産 *Asteromassaria* 様菌類は、子のう胞子の形態が *Asteromassaria* 属菌と類似するものの、円筒形で無色の分生子を形成する点で異なっていたため、狭義の *Asteromassaria* 属菌ではないものと予想された。そこで、日本産 *Asteromassaria* 様菌類の13菌株について、標本上および培養下における有性・無性世代の形態観察と、SSU-ITS-LSU nrDNA, EF-1 α , RPB2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析を行い、本菌群の系統推定と種の特徴付けを試みた。その結果、本菌群はクロイボタケ綱・プレオスポラ目の系統に含まれるものの、プレオマッサリア科ではなく Cyclothyriellaceae と系統的に近縁であることが明らかになった。すなわち、本菌群は *Asteromassaria* 属ではないことが明らかとなった。さらに、本菌群は狭義 *Asteromassaria* 属菌の子のう果よりも殻壁側部が著しく発達する点で、有性世代の形態からも区別することができた。また、Cyclothyriellaceae 所属菌は球形で均等な厚さの子のう果殻壁と、フィアロ型分生子形成様式を持つのにに対して、本菌群は側部で発達し、基部で薄い子のう果殻壁と、アネロ型分生子形成様式を持つ点で、別科に所属するものと考えられた。形態的特徴が類似する科や属がプレオスポラ目内に存在しないことから、本菌群を収容するために、新科・新属を設立する必要があると考えられた。本菌群内には、さらに系統的に異なる2群が認められ、子のう胞子と分生子の大きさが異なる2新種が存在することも明らかとなった。

九町 健一¹, 玉利 大樹¹, 松山 伸太郎¹, 勝田 楓¹, Tisa S. Louis²¹鹿児島大・理, ²Univ. New Hampshire

窒素固定は大気中の窒素ガスをアンモニアに還元する反応であり、生態系への窒素源の供給に重要な役割を担う。窒素固定生物はバクテリアの様々な分類群に含まれるが、窒素固定酵素やその成熟に関わる酵素の遺伝子 (*nif* 遺伝子群) はすべての窒素固定細菌種で保存されている。*nif* 遺伝子の発現は、アンモニアが欠乏した時のみ活性化される。また、窒素固定酵素は酸素で容易に失活するため、それを防ぐしくみが存在する。すなわち、窒素固定酵素は必要なときだけ合成し、合成したものは無駄にしない、という節約のしくみが働いている。*nif* 遺伝子群の高度な保存度とは対照的に、その発現調節や酵素の酸素防御の機構は分類群間で多様性が見られる。このことは、水平伝播による *nif* 遺伝子群の獲得後に、各分類群が独立にそのようなしくみを進化させたことを想起させる。これらの分子機構は主にプロトバクテリアやシアノバクテリアで調べられてきたが、良いモデル細菌種を持たない他の分類群での研究は少なく、多様性の全体像は明らかでない。放線菌もそのような研究の遅れている分類群のひとつである。*Frankia* spp. は最も代表的な窒素固定放線菌である。私たちは、多細胞からなる菌糸を用いて機能欠失型の変異株を単離する方法を開発した。この方法により6782のコロニーをスクリーニングした結果、アンモニアを含まない (N-) 固体培地で生育異常を示す49の窒素固定変異株候補を単離した。12株についてN-液体培地での増殖速度とアセチレン還元活性を調べた結果、11株が窒素固定能を欠損していた。5株はベシクル (酸素防御能を持つ窒素固定専用の構造体) の分化に異常を示した。これらの多くは菌糸の形態に異常を示し、菌糸とベシクルの発達の関連性が予想された。10株ではN-での *nif* 遺伝子の発現が大幅に減少していた。8株のゲノムを解析した結果、6株は窒素固定に関わる既知の遺伝子に変異を持たず、新規な窒素固定関連遺伝子の発見が期待された。2株については、N-培地での生育が回復した復帰変異株を単離した。これらのゲノム配列を親変異株と比較したところ、変異株では変異型だが復帰変異株では野生型を示す塩基が見つかり、これらが変異表現型の原因である可能性が示唆された。

坂本 裕一¹, 佐藤 志穂¹, 宮崎 和弘²¹公益財団法人岩手生物工学研究センター, ²森林総合研究所・九州支所

日持ちのよいシイタケの育種への応用を目的として、シイタケ (*Lentinula edodes*) ゲノムの解読と子実体老化に関わる遺伝子の探索を行った。シイタケゲノム解読には、連鎖地図の作成に用いられているG408PP-4株を用い、ペアエンドライブラリ及びメイトメアライブラリより得られたショートリードのシーケンスとPacBioによるロングリードのシーケンスを用いてアセンブルを行った。その結果、scaffold数=1,951, N50=102kb, 総塩基長39Mbpとなり、良好なN50値を得る事が出来た。シイタケの全ライフステージを網羅した混合RNAよりRNA-seqを行い、そのリードと得られたシイタケゲノムを用いて遺伝子予測を行った。遺伝子予測ソフトとしてAugustusを用いて遺伝子予測を行ったところ、12,959遺伝子が予測され、他の担子菌類と同等の結果が得られた。収穫後のシイタケ子実体老化に関わる遺伝子を探索する目的で、Super-SAGE法によるトランスクリプトーム解析を行った。収穫直後の子実体と収穫後25°Cで保存した子実体中で発現している遺伝子を比較したところ、ひだの褐変化、細胞壁の分解に関わる遺伝子群及び転写因子の発現上昇が認められた。褐変化に関わる遺伝子として、すでにラッカーゼやチロシナーゼの発現が上昇することが知られていたが、収穫後に複数のラッカーゼ遺伝子 (*lcc4*等) の発現が上昇する一方、ゲノム上に複数遺伝子が確認されているチロシナーゼは、1遺伝子のみ発現上昇していることが明らかになった。Glycoside hydrolase (GH) ファミリー5, 16, 30, 55, 128, 及びThaumatin like proteinに属する β -1,3-1,6-グルカン分解酵素、及びGHファミリー18,20に属するキチン分解酵素をコードする遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。また、キトサン分解酵素として、GHファミリー75に属する遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。また、*exp1*をはじめとする、多数の転写因子の発現が収穫後に上昇することも明らかになった。今後TILLING法によりこれらの遺伝子に変異を持つ菌株をスクリーニングすることで、日持ちのよいシイタケを育種することを予定している。

高野 英晃^{1,2}, 見世 光¹, 萩原 健太¹, 平田 直哉¹, 渡辺 祥子¹, 高野 初美^{1,2}, 上田 賢志^{1,2}¹日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ²日本大学生物資源科学部生命科学研究所

LitRはMerRファミリーに属し、ビタミンB12をアンテナ分子として利用する新規なタイプの光センサー型転写調節タンパク質である。多様な細菌種にコードされるLitRファミリーはアンテナ分子結合領域のアミノ酸配列に基づいてクラスI～Vに分類され、B12を利用するClass I LitRは主にカロテノイド生産の光誘導に関与することが知られている。本研究では、光応答性細菌の探索において高頻度で分離されたグラム陽性の内生孢子形成細菌である*Bacillus*属細菌の光依存的なカロテノイド生産の誘導機構の解明を目的とした。本属の光依存的なカロテノイド生産に関する報告は見つからなかったことから、Class I LitRを有し、またB12生産菌として知られる*Bacillus megaterium* QM B1551株の解析を進めた。*litR*破壊株を取得したところ、明・暗の両条件下において構成的かつ高いカロテノイド生産を示した。取得した破壊株と野生株間でDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ、カロテノイド合成遺伝子群が*litR*破壊株において顕著に転写レベルが上昇していた。また、自然形質転換に関わることが知られている*spxA*や*comG*遺伝子群の転写も*litR*破壊株において比較的高いレベルを示した。次に、組み換え蛋白質を用いた複数の*in vitro*解析を実施した。暗条件におけるアデノシルB12(AdoB12)とLitR複合体は、カロテノイド合成遺伝子プロモーター領域に特異的に結合することで転写を抑制した。一方、明条件下ではAdoB12の光分解に伴うLitRのリプレッサー機能の低下によって、標的プロモーターからのRNAポリメラーゼによる転写開始が認められた。これらの結果は、細胞内で合成したB12を用いてLitRの機能を調節することで、明条件における光酸化ストレスから自身を保護するための、環境依存的な応答機構を有していることが考えられた。また、比較ゲノム解析より、*litR*保有*Bacillus*属細菌の中にはカロテノイド合成遺伝子を持たない細菌が存在していたことから、カロテノイドに代わる未同定の光応答性遺伝子の存在が示唆された。

榎本 友則¹, 兼崎 友², 佐藤 繭子³, 伏見 圭司¹, 池内 昌彦⁴, 豊岡 公徳³, 渡辺 智⁵, 成川 礼¹
¹静岡大・理学部, ²東農大・NGRC, ³理研・CSRS, ⁴東京大院・総合文化, ⁵東農大・バイオサイエンス

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行い、植物の葉緑体と同一の起源を持つ原核生物である。シアノバクテリアは、クロロフィルを結合した二つの反応中心が直列に繋がった光合成システムを有する。さらに、クロロフィルが吸収できない橙色の光質を吸収し、その光エネルギーを反応中心に伝達するアンテナタンパク質・フィコビリソーム（PBS）も有する。通常、シアノバクテリアは陸上植物と同様、クロロフィルa（Chl. a）を持つが、我々が研究対象とするAcaryochloris marinaは、Chl. aの代わりにクロロフィルd（Chl. d）を持つ。Chl. aが青色光と赤色光を吸収するのに対し、Chl. dは青色光と遠赤色光を吸収する。つまり、A. marinaは他のシアノバクテリアに比べて長波長の光質をエネルギーとして利用しているといえる。このことから、感知する光質も同様に長波長シフトしている可能性を着想した。モデルシアノバクテリアの光感知においては、シアノバクテリオクロムというビリン色素結合型光センサーが中心的役割を果たすことから、A. marinaでも同様にシアノバクテリオクロムの関与を想定し解析を進めた。その結果、通常のシアノバクテリオクロムはフィコシアノビルンという色素を結合し、赤色光と緑色光の光質の量比を感知するのに対し、A. marinaではフィコシアノビルンだけでなく、より長波長の光質を吸収できるビリベルジンという色素を結合することで、遠赤色光と橙色光の光質の量比を感知し得ることを見いだした（Narikawa et al. 2015 Sci. Rep., Fushimi et al. 2016 Front. Microbiol.）。この遠赤色光と橙色光という光質は、それぞれChl. dとPBSが主に吸収する光質である。そこで、これらの光合成装置の制御に関わっている可能性を考え、A. marinaを遠赤色光と橙色光で培養し、光質に対する短期応答としての順化機構、長期応答としての適応機構を解析している。順化機構解明のためにRNA-seq解析を行い、橙色光照射によるPBS関連遺伝子群の大幅な転写誘導を見いだした。適応機構の解析として橙色光、遠赤色光下での長期継代培養を進め、橙色光下でのPBS高蓄積株の取得に成功した。興味深いことに、PBS関連遺伝子群は全て同じプラスミドに存在するため、PBS高蓄積株では、そのプラスミドのコピー数が増加している可能性を考え、その検証を進めている。さらに電子顕微鏡により、PBS高蓄積株のチラコイド膜を詳細に観察し、蓄積機構を探った。

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所

赤潮原因藻ヘテロシグマは、夏季に急激に増殖して、水域の他の藻類を圧倒し、ほぼヘテロシグマのみからなる『ヘテロシグマ赤潮』を形成することで知られる単細胞藻類である。ヘテロシグマは、これまで、広く温帯域に生息し、赤潮を形成する種と認識されてきた。一方で、近年のモニタリングにより、ヘテロシグマが、熱帯や寒帯にも生息することが明らかとなっている。実際、最近、発表者は、熱帯に位置するブラジル リオデジャネイロのガンタナモ湾の底泥より、ヘテロシグマを数株単離した。以上のような、より広い水域からのヘテロシグマの発見は、単に、近年、より広い海域でモニタリングが徹底し始めたからか、或いは、近年の気候変動や大型船舶の航行にともなうバラスト水輸送などにより、生息域が拡大しているのかは、興味が持たれる。私たちは、北米・南米・ヨーロッパ・アジアなど複数の産地に由来するヘテロシグマのミトコンドリアゲノム配列の全長を解読し、配列比較を行った結果、超可変領域を見出した。さらに、その配列が、産海域に特有な配列を持つことを見出した。また、日本周辺の6海域から複数株のヘテロシグマを単離し、同じくミトコンドリア上の超可変領域配列を解読した。日本周辺から得られた株は、確かに配列のパラエティは見られたものの、水域ごとの特徴は見られず、本配列は、数100キロ程度の距離では系統地理学的マーカーとしては利用できないことが明らかとなった。この超可変領域は、mRNAとして転写されていることから、タンパク質コード領域である可能性が高く、また、類似したタンパク質の報告が見られないユニークなもので、機能は不明である。ミトコンドリア配列のうち、いわゆるControl regionsあるいはCOI遺伝子の配列は、系統地理学的マーカーとして利用されてきた。一方で、このような、超可変な未知の機能を有すると予想されるタンパク質コード領域は報告がない。発表者は、他にも多くのヘテロシグマの葉緑体ゲノムの全長配列を解読し、比較解析を行っている。ヘテロシグマのミトコンドリア、および葉緑体ゲノムの可変性の比較についての知見も併せて発表する。

微生物は代謝物など介して相互作用することで生態系を構成している。このような生態システムを解きほぐすことは医療、環境分野において重要である。この文脈において、微生物生態系ネットワークがしばしば注目される。一般に、そのようなネットワークは時系列データのような多点観測データを用いて統計的手法から推定される。しかし、このような推定法は経済的、計算コストが高い上に、生態系における分子メカニズムを議論することが難しい。そこで、代謝ネットワークを用いて微生物生態系構造を推定する新たな手法 Estimator of COmmunity Structure based on MetabOlic networkS (ECOSMOS) を提案する。このために、Borensteinらによって提案されたReverse Ecologyの考え方を用いた。具体的に、代謝ネットワークからグラフ理論的のアルゴリズムから栄養素を同定し、栄養素の供給や奪い合いから協力、競争関係を推定する。これに加えて、生態系構造を安定性を評価するために用いられるランダム行列理論を導入した。ECOSMOSは微生物間の代謝物相互作用を考慮し、少なくともひとつの観測データから、生態系ネットワークを推定する。ECOSMOSを実際のサンプルに適応した。例えば、健康な人の腸内細菌の生態系構造は極めて安定であることや、土壌微生物生態系における協力関係や安定性は環境的な摂動が与えられると増加することなどを見出している。ECOSMOSは微生物生態系構造の理解に役立つと期待できる。なお、ECOSMOSは <http://takemoto08.bio.kyutech.ac.jp/ecosmos-lite/> において利用可能である。

西嶋 傑^{1, 2, 3}, 鈴木 慶彦², 古田 芳一⁴, 須田 互^{2, 3, 5, 6}, 大島 健志朗², 森下 真一², 服部 正平^{2, 3, 5}
¹産総研・CBBDOIL, ²東京大・新領域, ³早稲田大・理工, ⁴北大・人獣共通, ⁵理研・IMS, ⁶慶應・医学

ヒト腸内マイクロバイームは宿主の健康と疾患に密接に関わる。近年、次世代シーケンサーを用いた大規模なメタゲノム解析により、ヒト腸内マイクロバイームを構成する膨大な遺伝子情報とそれらの多様性が明らかとなりつつある。しかし、それらの研究では主に数百bpほどのリードを出力する短鎖型シーケンサーを用いており、結果としてバクテリアのゲノム情報を断片的にしか再構成することができない。加えて、解析対象は主にゲノム情報に基づいた細菌種と遺伝子であり、ゲノムDNAの修飾であるメチル化等に関する知見は限られている。そこで我々は一分子リアルタイムシーケンス技術（PacBioシーケンサー）を用いて、健康な日本人被験者から得られた13の糞便サンプルに対しメタゲノム解析を行った。糞便からのDNA抽出には非常に長いDNA断片を調整できる酵素による溶菌方法を採用した。リードのアセンブリにはFALCON、コンティグのピニングにはMetaBAT、メチル化の検出にはSMART Pipeを用いて情報解析を行った。シーケンスの結果、平均リード長9kb、1サンプル当たり10Gbのメタゲノムデータが得られた。それらのデータをアセンブリし得られたコンティグをピニングした結果、7つの環状ゲノムを含む計101のバクテリアゲノム、加えて比較的小さい92の環状コンティグ（2.8～666 kb）が得られた。その環状コンティグはヒトの腸内に非常に頻度高く存在しているにも関わらず（>30%の被験者）今まで報告のない、新規プラスミドとファージのゲノム配列を多数含んでいた。さらに、我々はメタゲノムデータから431の新規モチーフを含む計503のメチル化モチーフを同定した。興味深いことに、それらのメチル化モチーフは同一菌種のゲノム間でも共通のモチーフ配列が非常に少なく、結果として各被験者のマイクロバイーム間で非常に高い多様性を示した。以上のように、一分子リアルタイムシーケンス技術を用いた解析により、短鎖型シーケンサーでは解析が困難であったマイクロバイームのゲノム、メチロームの全体像が明らかとなる。

星野 辰彦, 濱田 洋平, 稲垣 史生
JAMSTEC・高知コア

シーケンシング技術の急速な発展により環境中の微生物群集構造解析のハイスループット化が進み、その多様性、分布や環境との相互作用などの理解が飛躍的に深まっている。微生物群集構造を解析するためには、一般的に16S rRNAをターゲットとしたアンプリコンシーケンスが行われている。しかしながら、PCRの増幅効率に増幅するDNA配列、プライマー配列、あるいはPCR条件によりバイアスを受けることが知られており、得られたシーケンス数を定量的に扱うことができない。現状では、DNAのコピー数が必要な場合は別の定量分析（定量PCRやデジタルPCRなど）を行う必要があるが、各ターゲットに応じたアッセイ系を個別に構築する必要があるため多数の微生物種を同時に定量することは非常に困難である。我々は、この問題を解決するべくシーケンスと同時に得られた全ての微生物種の定量を行うことを可能とする定量シーケンス法 (qSeq) の開発を行ってきた^{1,2)}。 qSeqでは、まず最初にランダムシーケンスタグ (N8) を導入したプライマーにより1本鎖cDNAを合成する。合成されたランダムシーケンスタグを含むcDNAはPCRにより増幅し、通常通りシーケンスを行う。最後に得られたシーケンスライブラリから興味のある微生物種の配列を抜き出し、取り込まれているランダムシーケンスの種類数を数数することで、サンプルDNA中に存在していたコピー数を確率論的に求めることができる。本研究では、まず既知コピー数のgDNAを段階希釈しダイナミックレンジを測定した。今回のランダムシーケンスタグは $N8=4^8=65,536$ 種類の配列であるため定量可能なコピー数の上限は 5×10^4 程度であった。さらに、6種の微生物gDNAからなる模擬複合系にqSeqを適用した結果、通常のシーケンスライブラリよりも正確に種の構成比が再現可能であり、qSeqによる定量値は理論値と一致した。これらの結果は、qSeqが環境中の数百種類の微生物を同時に定量可能であることを示している。本発表では、qSeqの詳細なプロトコルについても発表し、さらにその問題点、今後の展望についても議論したい。1)Hoshino, T., and F. Inagaki (2017), PLoS One, 12(1), e01694312)Hoshino, T., and Y. Hamada (2017), J Biosci Bioeng, in press

O-057

集積培養中で最優占でない微生物を限界希釈法で純粋分離する場合の培養数の最適化

植田 晃輔, 福原 康平, 黒岩 恵, 諏訪 裕一
中央大・院生命

[背景・目的] 限界希釈法で純粋分離をする場合、目的とする菌を0.5 cell/tubeに希釈するのが良いとされている(Jorg, 2006)。好気性アンモニア酸化微生物(AOM)はしばしば限界希釈法で純粋培養されるが、集積培養中でのAOM菌数は共存する他の菌数をしばしば下回る。こうしたケースでは、培養への接種菌数を0.5 cell/tubeとするとAOMの接種菌数は0.5 cell/tubeを下回り、純粋分離される確率は下がる。経験則として、純粋分離に成功するまで段階希釈法を繰り返す戦略が取られてきたと見られるが、これ以外にも培養数を増やす方法が考えられる。これらは本質的に同じ戦略であるが、培養管が何本必要になるかに言及した議論は、われわれが知る限り見当たらない。本研究では、限界希釈した菌液中で、共存する他の微生物よりもAOMの方が接種される確率がより低い場合、AOMを純粋分離するために最低で何本の培養管が必要になるのかを導く確率論を提案する。また、実際にこれを用いてAOMを純粋分離の実験を計画し、純粋分離培養が得られることを検証した。[方法] 千葉県鴨川市で採取した森林土壌を758μM 硫酸アンモニウムを含む無機塩培地(pH 7.6)でMPN計数に用いた培養(AOM集積培養)をAOMの分離源とした。集積培養中の全菌数を計数し、AOM菌数は計数せず仮定した。集積培養をある希釈率で希釈した時の、AOMとそれ以外の微生物それぞれの細胞が新鮮培地に接種される確率を算出した。次に、AOM陽性かつAOM以外の細菌陰性となる培養が2本以上得られる(95%以上の確率で)、集積培養の希釈率と培養の本数の組み合わせを二項分布を用いて推定した(式1)。推定した設定で96穴プレートを用いて、モイストチャンバー内で室温、暗所で1ヶ月培養した。培養後、GI試薬を用いた比色法でAOMの生育の有無を判定し、AOM陽性と判定された培養を4 mLにスケールアップしてからTSB/4培地に500 μL接種し、1週間室温で培養し、Heterotrophが生育するかどうかを調べた。 $P(X) = {}^N C_x p^x (1-p)^{(N-x)} \dots \dots (式1)$ (N; 培養連数, x; 実際に接種される本数) $p = \text{菌密度}[\text{cell/mL}] \times \text{培養体積}[\text{mL}] / \text{希釈率} \dots \dots (式2)$ [結果] 集積培養中の全菌数は 8×10^6 cell/mLであった。経験則的にAOMの菌密度を 5×10^5 cell/mLと仮定し、 5×10^6 倍希釈、288連で培養を行い、狙い通り4本のAOM陽性かつAOM以外の細菌陰性の培養を得た。現在これらがAOMだけの培養であることを分子生物手法で確認中である。

井本 篤志, 榎林 俊樹, 杉浦 省三, 泉津 弘佑, 鈴木 一実, 入江 俊一
滋県大・院環

【背景】 クズ (*Pueraria montana*) はマメ科の多年生雑草としても知られており、農地や林地に被害を与えるほど繁殖力が強い。そのため定期的な刈り取りと除去が必要となるが、クズを有効資源化できれば、処理コストを相殺することが期待できる。一方、魚類養殖用配合飼料のために安価で環境負荷の少ない原料が求められている。前述のクズ葉は魚類養殖用配合飼料の原料とすることもできるが、ダイズ粕やナタネ粕などの飼料原料と比較して繊維分が多く、タンパク質含量が少ない。白色腐朽菌は低窒素状態で植物繊維質を効率的に分解することが知られており、クズにおける相対的なタンパク質含有量の増加が可能と考えられる。本研究は、ヒラタケによるクズの繊維含有率の減少とタンパク質含有率の増加について調べた。また、尿素添加の効果についても報告する。【方法】 クズ葉を約1 cm角に切断し、80℃で5日間乾燥させた。次に、500 ml容量の三角フラスコに乾燥物25 gと100 mM尿素液を100 ml入れシリコ栓をしてオートクレープし、これをクズ培地とした。ヒラタケN001株を植菌し、28℃で30日間静置培養した。培養後、残存尿素を測定する場合はddH₂Oを加えてワーニングブレンダーで培養物を破碎しながら抽出を行い、Jung法による測定を行った。粗タンパク量を測定する場合は、培養物をそのまま105℃で一晩以上乾燥させ、乾燥重量を測定後、ワーニングブレンダーで破碎した後にCNコーダーにて窒素量を測定し、6.25倍することで算出した。【結果と考察】 ヒラタケ処理を行うことでクズが分解され、尿素の有無にかかわらず乾燥重量が約40%減少した。これより、100 mM尿素液添加では菌糸生育に影響は無いと考えられる。中性デタージェント繊維の割合も菌処理前は38.9%であったのに対して、菌処理後には23.3%となり、尿素添加した菌処理では21.9%になった。また、菌処理によりタンパク質含有率が23.0%から25.8%へと有意に増加した。さらに、尿素添加した菌処理の場合は28.1%へと有意に増加した。菌による繊維質分解除去のため、相対的にタンパク含量が増加したこと他に尿素添加によるタンパク質含有率増加には、尿素の菌タンパク質(菌体キチン-Nを含む)への変換と優先的な尿素利用によるクズタンパク質分解抑制の両方が関与していると考えられる。後者の効果について、窒素源添加によるプロテアーゼ活性の変化などについて検討しているところである。

藤屋 寛子, 天知 誠吾
千葉大学大学院園芸学研究科

臭素酸(BrO_3^-)は、浄水場や排水処理施設で行われる高度浄水処理のオゾン処理過程で生成する副生成物の1つであり、発がん性が報告されている。現状では、処理水中の有機物濃度に応じてオゾン注入量を制御するなどの対策法があるが、完全な臭素酸除去は困難である。一方近年、臭素酸還元能を有するいくつかの微生物が報告されており、臭素酸還元への応用が期待されているが、これらの微生物の還元速度は非常に低く、メカニズムも不明な点が多い。これに対し、当研究室においては、既知細菌と比較して臭素酸還元速度が100倍以上速い*Rhodococcus* sp. Br-6株の分離に成功している。Br-6株は、微好気条件下においてのみ、臭素酸を臭化物に還元する。このとき、2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)と鉄イオンがそれぞれ酸化還元メディエーターとして機能していることが明らかになっている。そこで、本研究では、接種源、添加メディエーターの種類を変えて集積することで系統的・生化学的に異なる臭素酸還元細菌の単離を試み、環境中における臭素酸還元細菌の多様性を理解することを目的とした。酢酸を電子供与体、臭素酸を電子受容体として嫌気条件、微好気条件において集積を行った。その結果、海水を接種源とし、アントラキノン-1,5-ジスルホン酸二ナトリウム(AQDS)をメディエーターとして添加した微好気条件での集積系において最も速い臭素酸還元を確認した。この集積系からの純粋菌株の単離を試み、約4日間で250 μM の臭素酸を還元するM-Br株の単離に成功した。本菌株は16S rRNA遺伝子に基づく系統解析の結果、*Shewanella putrefaciens*と99.7%相同であった。*Shewanella*属細菌において臭素酸還元能の報告は初めてである。M-Br株の臭素酸還元におけるAQDSの影響を調べるための生育実験では、M-Br株はAQDSの有無に関わらず臭素酸を還元することが確認された。したがって、M-Br株は、AQDSをメディエーターとせず、*Rhodococcus* sp. Br-6よりも単純な新規の臭素酸還元メカニズムを有していることが推測された。

【背景・目的】セレンは半導体原料等として利用されるレアメタルであるが、水相での主要な形態であるセレン酸 (SeO_4^{2-} , Se(VI)) 及び亜セレン酸 (SeO_3^{2-} , Se(IV)) は生物に対する毒性が強いため、廃水からのセレンの除去・回収技術の確立が求められている。金属精錬工場排水溝より単離された*Pseudomonas stutzeri* NT-I¹⁾ 2) は、 Se(VI) 及び Se(IV) を不溶性の元素態セレン (Se^0) や揮発性のジメチルセレナイドに還元する極めて優れたセレン代謝能力を有し、廃水からのセレンの除去・回収プロセスへの活用が期待される。本研究では、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seqによりトランスクリプトーム解析を行い、NT-I株のセレン代謝に関わる遺伝子群を明らかにすることを目的とした。【方法】1mMの Se(VI) または Se(IV) を含むTSB培地20 mlに $\text{OD}_{600} = 0.6$ となるように*P. stutzeri* NT-Iを接種し、 Se(VI) については0.5時間、1時間、及び24時間後に、また、 Se(IV) については0.5時間と1時間後に培養液を採取した。RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen)を用いてRNAの安定化とtotal RNAの抽出を行った。RiboMinus (Thermo)を用いてribosomal RNAを除去した後、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo)を用いてライブラリを作製した。エマルジョンPCRでテンプレートを作製し、次世代シーケンサー(Ion PGM, Thermo)を用いたRNA-Seqを行った。CLC Genomic Workbench (CLC bio)を用いて発現量の解析を行った。【結果および考察】 Se(VI) および Se(IV) のいずれを添加した場合にも培養開始0.5時間後にcysteine desulfurase、cystathionine gamma-lyase等の含硫アミノ酸代謝に関わる酵素をコードする遺伝子群の転写が大幅に促進されたことから、セレン代謝と硫黄代謝は類似した経路により行われていることが示唆された。一方、細胞外粒子として Se^0 が形成された後に揮発性のジメチルセレナイドに還元される時間に相当する Se(VI) 添加24時間後には、膜輸送に関わるタンパク質をコードする遺伝子群の転写が促進された。これより、セレンの細胞外からの取り込みまたは細胞外への輸送がセレンの揮発化において重要な役割を担っているものと推測された。【参考文献】1) Kuroda, M. et al.: J. Biosci. Bioeng., 112:259 (2011) 2) Kagami, T. et al.: Water Res., 47:1361 (2013) 謝辞：本研究はJSPS科研費若手研究 (B) (課題番号：15K16145) の助成を受けて実施した。

廣田 隆一, 池田 丈, 荒川 賢治, 黒田 章夫
広大院・先端研

【目的】リン（P）は化学的に-IIIから+V価の酸化数を取ることが可能であるが、一般に生物が利用するリンは+V価のリン酸（ PO_4^{3-} ）である。また、環境中で測定の対象とされるリンについても、酸化還元状態の変化はほとんど考慮に入れられておらず、リンは自然界において酸化還元反応とは無縁の物質と考えられている。しかしながら、最近の研究からバクテリアには亜リン酸（ H_2PO_3^- , P酸化数+III）や次亜リン酸（ H_2PO_2^- , 同+I）など還元型のリン化合物を「酸化」する能力を持つものや、+III価のリンを生じるリンの「還元」を行うものが存在することが明らかにされつつある。これらの経路の存在は、環境中に酸化状態の異なるリン化合物が存在することを示唆しているが、リンの生物循環に対する貢献度や微生物生態に及ぼす影響はほとんど分かっていない。演者らはバクテリアの還元型リン化合物の代謝機能を活用したバイオ技術開発を行っており、その実用的利活用のためにも環境中における還元型リン化合物の動態把握が必要である。本研究では、亜リン酸の酸化を行う微生物の単離と解析、およびリンの還元によりホスホン酸（ R-HPO_3^- , P酸化数+III）を生じる微生物群の解析を行った。【方法・結果】還元型リン化合物の酸化能を有するバクテリアは、培地中のリン源を置換した培地を使用してスクリーニングすることで得ることができる。亜リン酸を唯一のリン源とした培地を用いて、土壌、淡水中のバクテリアを対象に亜リン酸酸化能を調べたところ、直接的なスクリーニングでは有意な増殖を示すものは得られなかったが、集積培養を行うことで数種類の亜リン酸酸化細菌が得られた。リンの還元を行う微生物については、放線菌や一部のバクテリアが高エネルギーリン酸化合物であるホスホエノールピルビン酸（PEP）を介して+III価のリンであるホスホン酸を生成することが報告されている。PEP mutase(PepM)はP(+V)からP(+III)の直接的な還元を担う鍵酵素である。PepMの保存領域を対象とした縮重プローブを用い、広島大学微生物資源コレクション（HUT）保有の放線菌ゲノムを対象にPCRを行い、*pepM*保有菌株の探索を行った。その結果、83株のうち少なくとも8株が陽性であり、*pepM*陽性であると示唆された。

高部 由季¹, 鈴木 聡², 花田 智¹¹首都大・院生命, ²愛媛大・沿岸セ

水圏における光合成というと、高等植物、藻類、シアノバクテリアによる「酸素を発生する」光合成、いわゆる無機炭素から有機物を生み出す基礎生産と呼ばれるものがまずは思い浮かぶかもしれない。一方、「酸素を発生しない」光合成の物質循環における意義と、その意義の多様性はほとんど議論されてこなかった (Hanada 2016, *Microbes Environ.* 31:1-3)。「酸素を発生しない」光合成を行う生物は、酸素非発生型光合成細菌と呼ばれ、基本的には嫌気環境に生育することを好むため、酸化環境をその大半とする現在の地球においては、限定的な環境に生きている。一方、酸化環境に極めてよく適応した「酸素を発生しない」光合成をする生物がいる。それが、酸素非発生型好気性光合成細菌 (Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria, AAnPB) と呼ばれる一機能細菌群である。近年、AAnPBの海洋炭素循環への寄与の高さが議論されている。本研究では、本邦沿岸域においてAAnPBの分布、現存量、増殖速度を調べ、その炭素循環への寄与を見積もり、先行研究での他海域との比較を行った。岩手県大槌湾、愛媛県宇和海において、2007年から2014年にかけて不定期で観測を行い、赤外蛍光顕微鏡直接計数法を用いて、AAnPB細胞数を算出した。現場観測によるAAnPB現存量の時空間変動および、現場海水を用いたマイクロコズム実験による増殖速度を調べた結果として、AAnPBは上記観測域に普遍的に分布し、さらに、時空間的に高い現存量変動幅を持ち、増殖速度は他の従属栄養細菌より有意に速かった。AAnPB現存量は全細菌に対して最大で24%、その増殖速度は非AAnPBに対して最大で3.9倍速かった。これら現存量と増殖速度の結果は、先行研究のそれらと比較すると、全球海洋の中でも高かった。以上から、AAnPBは本邦沿岸域において物質循環に高い寄与率を有していることが示唆された。その物質循環は、炭素だけでなく、窒素、リンといった複数の主要元素循環にも関連している可能性がある。増殖速度が速いということは、DNA合成、タンパク質合成が活発で、細胞内の窒素とリンの含有量が高い可能性がある。また光合成能により、他の従属栄養細菌よりも増殖効率が高い可能性もある。物質循環への寄与とその意義については、見かけの量の議論だけでなく、その元素構成比や、呼吸量を考慮した増殖効率といった質を見ることで、その意義の多様性を今後は明らかにしていく必要がある。

諸星 知広¹, 尾形 健人¹, 大倉 徹雄², 佐藤 俊輔²¹宇都宮大・院工, ²(株)カネカ

海洋中で大きさ5 mm以下に微細化したマイクロプラスチックが深刻な環境問題を引き起こしている。環境中で微生物により分解可能な生分解性プラスチックの使用は、マイクロプラスチック問題解決の一助となると考えられているが、海洋中での生分解性プラスチックの分解挙動に関しては不明な点が多い。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、細菌により生産されるバイオフィラストックの一種である。PHA共重合体であるポリ3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシヘキサノエート (PHBH) は、高い生分解性や成形加工性を兼ね備えたプラスチックであり、幅広い利用が見込まれている。本研究では、海洋中におけるPHBH分解挙動を明らかにするために、PHBHフィルムに形成するバイオフィルムの菌叢を解析するとともに、PHBH分解細菌の単離を行うことを目的とした。まず、PHBHフィルムを2×3 cmに切断し、海水サンプル中で振とうしながら二週間から一ヶ月間インキュベートを行った。3回の実験で合計16枚のPHBHフィルムで試験したところ、すべてのPHBHフィルムに大量のバイオフィルム形成が見られ、一部はフィルムが崩壊していた。フィルム表面に形成されたバイオフィルムを採取し、抽出したゲノムDNAから16S rRNA塩基配列を決定したところ、PHBHフィルムの分解が進行中で崩壊していない9枚のフィルムでは、主に *Glaciecola* 属細菌を含む *Alteromonadaceae* の割合が高いことが明らかとなった。一方で、PHBHフィルムの分解が進み、一部が崩壊した7枚のフィルムでは、*Alteromonadaceae* がほとんど見られなかったことから、フィルムの分解に伴い、菌叢が変遷する可能性が示唆された。次に、バイオフィルムから単離したコロニーの中から、PHBH分解活性を示す細菌をスクリーニングしたところ、いずれも *Alteromonadaceae* に近縁の3株を単離することに成功した。以上から、初期バイオフィルム中に存在する *Alteromonadaceae* によって部分的に分解されたPHBHポリマー成分を利用して、他の細菌種が優先化する可能性が示唆された。

星子 裕貴¹, 林田 彩花², 前田 憲成¹¹九州工大院・生命体, ²九州工大・工

【目的】日和見感染症の原因菌である緑膿菌は、細菌の密度に応じてクォラムセンシング(QS)と呼ばれる仕組みから色素や酵素などの様々な物質を産生する。近年、QS阻害による新規感染症対策技術の応用が期待されており、抗がん剤として知られる5-フルオロウラシルが緑膿菌PA14株の細菌間コミュニケーションに影響を及ぼし、バイオフィームを抑制するという報告がある。一方、緑膿菌はバイオレメディエーションでよく使われる菌種であり、優れた分解能を保持していることも知られているため、本研究では、緑膿菌PA14株とPAO1株を用いてQS阻害と緑膿菌の5-フルオロウラシル分解能との相関性を調査することを目的とした。【方法】緑膿菌PA14株とPAO1株、それぞれの野生株とQS変異株を用いてHEPES緩衝液中の384 μ Mのフルオロウラシルを混合し、37°C、120 rpm、好気性条件で反応させ、HPLCにて生分解性を評価した。また、96ウェルプレートに0, 8, 38, 77, 192, 384 μ Mのフルオロウラシルを含んだLB液体培地を用意した。菌液の初期濁度を0.05になるよう調整し、37°C、好気条件下で静置培養を行った。その後、クリスタルバイオレット染色によりバイオフィーム形成量の評価を行った。

【結果と考察】PA14株は野生株、QS変異株ともにフルオロウラシルを分解できることがわかった。それに対し、PAO1株は野生株、QS変異株ともにあまりフルオロウラシルを分解しなかった。また、PA14株は野生株、QS変異株ともにフルオロウラシルによるバイオフィーム形成阻害が起きていたが、PAO1株は野生株、QS変異株ともにバイオフィーム形成阻害は起きていなかった。したがって、本研究によってフルオロウラシルによるバイオフィーム形成阻害効果は分解能に依存していることが示唆された。

超好熱性アーキアは真核生物の起源に最も近い原核生物といわれているが、その生理生態については未解明の点が多い。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1は同属のアーキアよりも高いバイオフィーム形成能を有する。バイオフィームは単細胞の集合体であるのにもかかわらず、多細胞生物のように細胞の役割を協調的に分化させる現象も報告されていることから、KOD1のバイオフィーム形成メカニズムを解明することによって、生命の多細胞化という進化の謎を解く手がかりが得られるかもしれないと考えた。これまでに、KOD1の固着細胞ではアーキアの細胞壁必須構成タンパク質S-layer protein (*Tk-Slp*)の発現量が浮遊細胞と比較して増加することがわかっている。さらに、大腸菌の*Tk-Slp*過剰発現株において細胞凝集性とバイオフィーム形成量が増加した。これらの結果から、*Tk-Slp*が大腸菌においても細胞表層に局在し、直接的に細胞に固着・凝集性を与えることが示唆された。そこで、*Tk-Slp*組換えタンパク質の細胞内局在を調べるために免疫染色法による細胞の観察を試みた。大腸菌には外膜・内膜の2つの細胞膜があるため、浸透圧ショック処理によって外膜を除去した細胞と未処理の細胞を調製し免疫染色した。その結果、抗*Tk-Slp*抗体によるシグナルは外膜除去細胞・未処理細胞いずれにも観察され、その強度は前者の方が大きかった。このことから大腸菌細胞では*Tk-Slp*は外膜・内膜いずれにも局在し、一部は細胞表面に露出していることが強く示唆された。さらにKOD1未処理細胞でも抗*Tk-Slp*抗体を用いて免疫染色を行い、シグナルが観察されたことから*Tk-Slp*が細胞外に露出していることを確かめた。また、*Tk-Slp*過剰発現大腸菌の細胞表層を観察したところ、突起物のような構造が見られた。この構造は非組換え大腸菌では見られなかったことから、*Tk-Slp*の過剰発現に由来するものだと考えられる。以上の結果から、KOD1由来S-layer protein (*Tk-Slp*)は大腸菌において、細胞外に露出すると共に突起構造を形成させて、細胞凝集およびバイオフィーム形成に直接的に関与する可能性が強く示唆された。

嶋 直樹¹, 朝井 真一², 陳 明皓³, 齋藤 正男⁴, 奈良井 峻³, 大村 直樹³, 鈴木 勉⁵, 姚 関^{3, 6}, 田中 良和^{3, 6, 7, 8}, 渡辺 公綱¹
¹産総研・創薬基盤, ²JBIRC・JBIC, ³北大・生命科学院, ⁴東北大・多元研, ⁵東大・院工, ⁶北大・先端生命科学院, ⁷さががけ, ⁸東北大・院生命科学

コドンとアミノ酸を結び付けるtRNAには多数の転写後修飾塩基があり、なかでも硫黄修飾はコドン認識や立体構造の安定化などの役割を担う (1)。一部の好熱性細菌では高温下でtRNAの54位のウリジン塩基が硫黄化修飾される (2-チオリボチミジン (s²T))。硫黄修飾によりtRNAは耐熱化され、高温でのタンパク質合成が可能となる。私たちは好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* をモデルに複雑な硫黄導入機構の解析を進めているが、真核生物細胞質tRNAのコドン認識に重要な硫黄修飾s²U (34位) の生合成とも良く類似している。

T. thermophilus ではシステイン脱硫酵素、TtuA~TtuDがtRNAの硫黄化を担う (2, 3)。TtuBが活性化硫黄を結合しチオカルボキシ体 (R-COSH) となり、硫黄化酵素TtuAが硫黄をtRNAに導入する。一方でTtuBは真核生物のユビキチンに似た構造を持ち、TtuCはユビキチンE1酵素と相同性がある。TtuBは複数のタンパク質に共有結合していた。特に硫黄化酵素TtuAの活性中心近傍のLys残基がTtuB化されており、TtuB化修飾が硫黄修飾塩基の生合成を制御していると考えている (4)。これは真正細菌における新規なタンパク質機能制御機構であり、真核生物ユビキチン系の祖先系であるとも考えられ興味深い。

完全無酸素条件下での分光学と生化学解析により、硫黄化酵素TtuAは酸素感受性の鉄硫黄クラスターを活性に必要とすることが判明した (5)。さらに立体構造解析から活性中心の3つのCys残基に [4Fe-4S] 型クラスターが結合していることが明らかになった (5)。そのため一つの鉄原子が硫黄原子等を結合できる状態となっており、反応中心として機能していることが強く示唆され、新規の硫黄化反応機構を提案した。

(1) Shigi, N, Front. Genet., 5, 67, 1-11, 2014 (総説) (2) Shigi, Nら, EMBO J, 27, 3267-3278, 2008 (3) Shigi, Nら, FEBS Lett, 590, 4628-37, 2016 (4) Shigi, N, JBC, 287, 17568-17577, 2012 (5) Chen Mら, PNAS, in press

元根 啓佑^{1, 2}, 高木 俊幸^{2, 3}, 油屋 駿介^{1, 2}, 新里 宙也³, 長崎 幸夫⁴, 竹山 春子⁵, 青木 航¹, 植田 充美¹
¹京大院農, ²日本学術振興会特別研究員, ³東大大気海洋研, ⁴筑波大院数理物質, ⁵早稲田大理工

サンゴ礁は海洋面積のわずか0.2%を占めるに過ぎないが、全海洋生物種の約25%が生息する、地球上で最も生物多様性の豊かな環境の一つである。サンゴ礁を構成するサンゴは刺胞動物に分類され、プラヌラと呼ばれる幼生の時期を経て、親サンゴへと成長していく。また、サンゴは微細藻類の褐虫藻をはじめとする様々な微生物と共生関係を築き、「サンゴ共生体」を形成している。しかし近年、海水温上昇などの影響でサンゴ礁の破壊が世界中で進行しており、サンゴの約3分の1の種が絶滅の危機にあると言われている。海水温上昇は、サンゴ幼生の死滅や親サンゴの白化（褐虫藻を失うことで白くなる現象）を引き起こし、「サンゴ共生体」の崩壊や、サンゴ礁に生息する多種多様な生物の消滅につながることから、早急な「サンゴ共生体」の保護技術の開発が求められている。サンゴの死滅や白化は高温ストレスにより異常に産生された活性酸素種により引き起こされると考えられている。本研究では、高温条件下で飼育されたサンゴ幼生の生存率を向上させることを目的とし、活性酸素種を消去するために設計されたRedox nanoparticle (RNP) の活用を検討した。RNPは、中分子量ポリマーに抗活性酸素剤であるニトロキシドラジカルが共有結合した構造をとっており、正常細胞の電子伝達系などに障害を与えず、過剰に産生した活性酸素種のみを選択的に消去することが可能である[1]。33度の高温条件下で飼育したサンゴ *Acropora tenuis* の幼生に対してRNPを投与したところ、生存率の向上が認められた。また、我々が開発してきたモノリスカラムを用いたプロテオーム解析[2]により、RNPを投与されたサンゴ幼生では、活性酸素種の産生に応答する酵素群の生産が減少していることが明らかになった。これらの結果から、RNPが過剰な活性酸素種を消去することで、高温ストレス下におけるサンゴ幼生の生存率の向上に寄与していると考えられた[3]。RNPは活性酸素種を効果的に消去できることから、白化の防止にも役立つと考えられ、「サンゴ共生体」の保護にも活用できることが期待された。[1] Nagasaki, *Ther. Deliv.*, 3, 165-179 (2012)[2] Kitahara *et al.*, *AMB Exp.*, 5:41 (2015)[3] Motone *et al.*, submitted

渡邊 圭司¹, 須田 互², 池田 和弘¹, 柿本 貴志¹¹埼玉県・環科国セ, ²理研・IMS

リンは、停滞性河川や湖沼の富栄養化を引き起こす原因物質であり、その水圏環境中での動態解明は重要な課題である。これまでに、Rhodocyclaceae科のIRD18C08クラスターに属する浮遊細菌が河川から高頻度に検出されること、また、それらは細胞内に高濃度でリンを蓄積する能力を有することを発見した。本研究では、この浮遊細菌について、生理学的特性および生態学的特性を明らかにすることを目的とした。分離株による炭素源資化性試験では、糖やアミノ酸にほとんど資化性を示さず、有機酸のみ幅広く様々な種類が利用できることが明らかとなった。窒素源については硝酸塩を利用することができることから、河川環境に適している系統群であると言える。ドラフトゲノム解析の結果、ポリリン酸キナーゼは*ppk1*および*ppk2*を有していることが明らかとなった。埼玉県内河川5地点で行ったCARD-FISHの結果、IRD18C08クラスターに属する細菌は全浮遊細菌の10%程度存在していることが明らかとなった。以上のことから、IRD18C08クラスターに属する浮遊細菌は、河川リン循環において重要な役割を担っているものと推察される。

宮田 直幸¹, 古田 世子², 岡野 邦宏¹, 藤林 恵¹, 池谷 仁里³, 一瀬 諭²¹秋田県大・生物資源, ²琵琶湖環境科学研究センター, ³兵庫県大・生命理学

琵琶湖北湖今津沖の湖底（水深90 m付近）では、2002年以降、メタロゲニウム粒子と呼ばれるフィラメント状マンガン酸化物粒子の発生が観測されるようになった。メタロゲニウム粒子は底質から溶出したマンガンイオンが生物酸化されて生成すると考えられているが、マンガン酸化に関与する微生物の生態や粒子生成を引き起こす環境要因は不明である。本研究はメタロゲニウム粒子形成能をもつマンガン酸化細菌*Bosea* sp. BIWAKO-01株をモデル生物として扱い、その培養特性に着目することによって琵琶湖底層部でのマンガン酸化プロセスを解明することを最終目的としている。BIWAKO-01株の培養液によるメタロゲニウム粒子生成では寒天等のゲル状多糖を添加する必要がある。2014年から2016年度にかけて湖水中の多糖濃度を測定した結果、表層部では、発生した植物プランクトンの細胞体積と多糖濃度には正の相関が認められた（ $p < 0.01$ ）。また総じて濃度は低かったが多糖は水深90 mでも検出され（上層部の30～100%）、さらに底層部のメタロゲニウム粒子は多糖マトリクスに付着した状態で観察された。これらの結果から、上層部で発生した植物プランクトンが湖底に沈降し、多糖の供給源としてメタロゲニウム粒子生成に関与することが示唆された。2016年7月から2017年2月の期間、水深90 mで採水した水試料及びその直下の底質を対象として、16S rRNA遺伝子アンプリコン解析による真正細菌叢の調査を行った。その結果、両試料とも調査期間を通じて細菌叢に大きな変動はなく、また両試料の細叢はよく一致していた。*Thermomarinilinea*属、*Desulfobacteraceae*科、*Anaeromyxobacter*属などに近縁の嫌気性細菌が主要な細菌群として検出されたが、一方で*Bosea*属細菌はほとんど検出されなかった（シーケンス検出率0.01%以下）。嫌気性細菌が優占する水深90 m付近では好気性の*Bosea*属は生息していないと推察された。*Bosea*属が湖底でのメタロゲニウム粒子生成に関与するならばその生息域はどこか、今後詳細に検討する必要がある。

四本木 彰良¹, 松田 知樹¹, 加山 基¹, 木下 雄介², 日高 清隆³, 石川 輝⁴, 民秋 均², 柏山 祐一郎^{1, 2}
¹福井工大・環境食品, ²立命館大学・院生命科学, ³中央水研, ⁴三重大学・院生物資源

中低緯度の貧栄養海域ではプロクロロコッカス属のピコシアノバクテリアが高度に優占する。プロクロロコッカスについては、直径が $0.6\mu\text{m}$ 程度の微細な球形細胞であるため、フィルターフィーダーである多細胞動物プランクトンが植物プランクトンを捕食するという海洋生態系の古典的なパラダイムが全く通用しない。従って、これらによる基礎生産が外洋生態系に組み込まれるメカニズムは未解明のままである。ウイルスによる溶解を経由した微生物ループへの供給というルートの可能性を除けば、プロティスト（原生生物）による食胞作用によるプロクロロコッカスの捕食を起点とした、より大型の生物へエネルギーを供給する食物網が存在する可能性が考えられる。そこで我々は、プロクロロコッカスに固有な光合成色素であるジビニルクロロフィル類の捕食者による代謝産物に着目した。多様な系統に属する微細藻類捕食性のプロティストが、食胞作用の過程でクロロフィル類（Chl類）を光毒性の無い色素であるシクロフェオフォルバイドエノール類（CPE類）に分解代謝することが知られている（CPE代謝）。しかし、プロクロロコッカスは、通常のChl類の代わりにジビニルクロロフィル類（DV-Chl類）を有するため、プロティストに捕食された場合にはジビニル型のCPE（DV-CPE類）が生成されと考え、このDV-CPE類を指標とした捕食過程の検証を試みた。本研究では、黒潮流軸を挟んだ南北の海域（北緯 $30^{\circ}/34^{\circ}$ ）における層別採水試料中の懸濁粒子を、船上にてタンジェンシャルフローシステムで限外濾過膜を用いて濃縮し、高速遠心分離機を用いて沈殿させて分離し、液体窒素で凍結保存した。これら試料の抽出物のHPLC分析において、有機合成により得られた標準試料を用いてDV-Chl-a由来のDV-CPEが同定・検出された。さらに、DV-Chl-b由来のDV-CPEと考えられる化合物も有意な量検出された。これらの結果は、プロクロロコッカスの少なくとも一部が、CPE代謝をおこなうプロティストに捕食されていることを示唆した。さらに、採水試料にプロクロロコッカスの培養物を添加する船上培養実験をおこなったところ、特異的に応答して増殖する様々なナノ・プロティスト（主に $<10\mu\text{m}$ ）が確認された。これらを単離・同定して培養したところ、複数の系統で、実際にプロクロロコッカスを餌とした増殖実験によってDV-CPEが産生されることが確認された。

伊藤 通浩^{1, 2}, 岡田 直子², 丸山 徹³, 新里 宙也^{4, 5}, 座安 佑奈⁵, 藤村 弘行⁶, 中野 義勝¹, 須田 彰一郎⁶, 竹山 春子^{2, 3}
¹琉球大・熱生研, ²早大・ナノ・ライフ, ³早大・先進理工, ⁴東京大・大気海洋研, ⁵OIST・マリンゲノミックス, ⁶琉球大・理

【背景】サンゴには、海水中の細菌叢とは全く異なる「サンゴ共生細菌叢」が形成される。我々は、サンゴ共生細菌叢の環境指標としての有用性を検証する目的で、沖縄県瀬底島周辺の環境の特徴が異なる2定点のサンゴ (*Acropora tenuis*) の共生細菌叢を毎月の頻度で追跡してきた。2015年までの約1年の解析から、サンゴ共生細菌叢には、i) 経時的な変動があること、ii) 地点ごとに特徴があること、iii) 群体ごとの特徴もあること、が判明した (伊藤ら, 微生物生態学会第30回大会, 2015)。サンゴは高水温等のストレス条件で白化する。白化とは、サンゴ細胞内の共生藻の密度が低下してサンゴが白く見える現象である。2015年は、定点付近では白化が観察されなかった。一方、2016年では、夏季の海水温上昇に伴い、多数のサンゴが白化した。サンゴ共生細菌叢は、宿主が白化に至る過程で、また白化から回復する過程で、どのように変動するのであるのか。この変動は、白化のなかった年とどのように異なるのであるのか。これらのことを明らかにするため、本研究では、2016年までの2年にわたるサンゴ共生細菌叢を総合的に解析した。【方法】沖縄県瀬底島周辺の、陸地と離礁に囲まれた「イシカワバル」と、外洋に面した「瀬底南」を定点とし、双方に棲息するサンゴ種 (*A. tenuis*) のそれぞれ特定の5 群体を追跡した。試料はこれらの各群体から1度に1枝ずつ採取した。サンゴ共生細菌叢は、サンゴ組織由来のメタゲノムDNAを鋳型として16S rRNA遺伝子V1-V2領域をPCR増幅し、増幅産物をIon PGMで解析することで調べた。共生藻密度 (cell/cm²) は血球計算盤を用いた直接検鏡により算出した。【結果・考察】2016年8月、追跡中のサンゴ群体の全てにおいて白化が視認され、実際に共生藻密度が低下していた。しかし、同年9月以降、それら全てが回復した。この間、サンゴ共生細菌叢に前年に見られない変化があった。すなわち、2015年夏季には共生細菌叢は比較的安定していたのに対し、2016年夏季では、菌叢の優占菌群の一つの相対頻度が明瞭に低下した。その後、同年12月には、白化以前と類似する菌叢になった。共生細菌叢の地点ごとおよび群体ごとの特徴は、白化の過程においても概ね維持された。以上から、サンゴ共生細菌叢の形成・維持機構は、白化をもたらす環境変動と、宿主が死なない程度の白化に対して、頑健であることが示唆された。

微生物は水圏の溶存態有機物のほぼ唯一の消費者（スカベンジャー）であり、海洋炭素循環の速度に大きな影響を与えている。一方で海洋は全般に栄養の乏しい環境である。こうした環境で、微生物がどのようにして効率よく溶存態有機物を収集しているのか、その行動戦略はこれまで不明な部分が多かった。そこで我々はライブ可視化技術を用いた解析を行った。水圏では、溶存態有機物は不均一に分布しており、海洋粒子のようなホットスポット（餌場）に局在している。我々は、海洋細菌 *Vibrio ordalii* がこうした餌場にどれくらいの時間滞在するのかを、モデル海洋粒子と一細胞トラッキングを用いて詳細に観察した。その結果、*V. ordalii* は個々の海洋粒子から得られる栄養を一部諦めること、そしてその代わりにより多くの海洋粒子を訪れることで単位時間あたりの栄養獲得量を増大させるという戦略をとっていることが明らかとなった。これはマクロ生態学の基本的な原理である最適採餌戦略と非常によく似ている。一方で我々の数理モデルは、海洋細菌の最適採餌戦略は、高等生物の場合とは異なり長期記憶を必要としないことを示した。我々はまた、海洋でみられる微小スケールの攪拌現象の採餌行動への影響も分析した。このためにロボットアームにより精密なパターンで攪拌を行う実験装置を開発した。実験の結果、攪拌により溶存態有機物が素早くフィラメント状に引き伸ばされるような条件下でも、海洋微生物は走化性により有機物に効率的にアクセスできることが実証された。これらの結果は、海洋微生物の採餌能力が時空間的にダイナミックな海洋の栄養環境に高度に適応していることを示している。

原 新太郎¹, Hafidah Siti Nur¹, 鶴丸 博人¹, 浅野目 謙之², 南澤 究¹
¹東北大・院生命, ²山形農総セ

【背景と目的】連作によるダイズの収量低下が報告されているが、圃場毎に原因は異なり、不明な点が多い。そこで、本研究では連作年数と地上部内生細菌叢の関係を明らかにすることを第一目的とした。また、連作により英での相対存在比の増加が認められた *Methylobacterium* 属細菌の、英組織内分布と分離株の系統・特性について明らかにすることを第二の目的とした。

【実験方法】2015年に山形県酒田市のダイズ連作圃場で栽培されたダイズの地上部（連作2・5・8年目）を用いて、連作と地上部各器官の細菌群集構造の関係を調べた。地上部は英、茎、葉柄、葉身の4部位に分け、細菌細胞濃縮法により細菌DNAを抽出した。16S rRNA遺伝子V4領域のアンプリコン解析を行い、QIIMEを用いてOTUのクラスタリングおよびβ多様性の解析を行った。連作8年目ダイズの英を4組織（英壁、腹側レプラム、背側レプラム、種子）に分け、メタノールを唯一の炭素源とする *Methylobacterium* 属細菌用AMS選択培地上で生菌数を測定し、分離株の16S rRNA遺伝子配列による系統解析およびAMS培地上での窒素利用について検討を行った。

【結果と考察】主座標分析より、連作によるダイズ地上部の細菌群集構造変化は英において、連作2年目とそれ以上（5・8年目）で異なっていた。各OTUの相対存在比を比較したところ、英の *Methylobacterium* 属細菌の相対存在比は連作2年目で4%程度であったが、連作5・8年目では約12%に達していた。 *Methylobacterium* 属細菌密度は英腹側レプラムで組織新鮮重（g）あたり 2.2×10^7 cfuと最も高く、英壁および背側レプラムでそれぞれ 1.0×10^7 cfu、 6.5×10^6 cfu検出されたが、種子からはほとんど検出されなかった。 *Methylobacterium* 属細菌分離株の99%は同一の16S rRNA遺伝子配列で、*M. extorquens*と近縁であった。分離株はウレイドまたは尿素を唯一の窒素源として生育可能であった。英の腹側レプラムは維管束密集部位であり、ウレイド濃度が高いと推定されるので、連作ダイズ英組織内での *Methylobacterium* 属細菌の動態とウレイド代謝の関連が疑われた。

三星 暢公^{1,3}, 紀岡 雄三¹, 野口 勝憲², 浅川 晋³¹片倉コープアグリ(株)筑波総合研究所, ²片倉コープアグリ(株), ³名古屋大・院生命農

【目的】作物の生産現場において土壌病害は収量低下の原因の一つである。中でも土壌伝染性フザリウムは被害を及ぼす作物の種類が多く、防除が困難である。一方で、土壌病害の発生が少ない発病抑止土壌が知られており、土壌理化学性以外に土壌生物性が抑止性の要因として考えられている。しかし、土壌の発病抑止性に関わる実用的な生物性評価法がないため、発病抑止性の診断のためフザリウム共培養法による評価法を検討している。これまでに、ポット試験でハウレンソウの発病度とフザリウム共培養法によるフザリウムの増殖程度との関係を明らかにした (Mitsuboshi *et al.*, 2016)。本研究では、発病抑止性を示す有機物連用試験圃場の土壌について、フザリウム共培養法による発病抑止性の評価が可能かどうか検討した。【方法】土壌は名古屋大学附属農場（愛知県）の連用圃場（黄色土）の無肥区、化肥区、慣行区、コーヒー粕堆肥区および厩肥多施用区、片倉コープアグリ(株)筑波総合研究所（茨城県）の連用圃場（黒ボク土）の無機化成区、なたね油かす区、魚かす区、蒸製骨粉区および混合有機区から採取した。各土壌へ病原性フザリウムを接種し、発病度およびフザリウム共培養法によるフザリウムの増殖抑制程度を調査した。用いた病原菌はハウレンソウ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* MAFF 103060) およびサラダナ根腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* MAFF 744028)、作物はハウレンソウ（“おかめ”、タキイ種苗(株)）およびサラダナ（“岡山サラダナ”、タキイ種苗(株)）である。フザリウム共培養法は土壌の懸濁液を希釈した寒天平板培地の中央へ予め培養したフザリウムの寒天片を置き、一定期間培養後に増殖したフザリウムのコロニーの大きさを測定した。【結果】ハウレンソウ萎凋病菌の接種試験によるハウレンソウの発病度はコーヒー粕堆肥区、厩肥多施用区およびなたね油かす区の土壌で低く、フザリウム共培養法によるフザリウムのコロニーの増殖はコーヒー粕堆肥区およびなたね油かす区の土壌で抑制された。病原菌接種試験の発病度とフザリウム共培養法によるフザリウムの増殖程度との関係はハウレンソウ萎凋病菌で相関があったが、レタス根腐病菌は明確ではなかった。ハウレンソウ萎凋病ではフザリウム共培養法により有機物連用圃場の土壌の発病抑止性の評価が可能であると考えられた。

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

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、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。しかし、秋田県大館市に27年間ダイズを連作していても高収量を維持し、ダイズ黒根腐病などの病害がほとんど発生しない圃場がある。この圃場では、特定の乾燥鶏糞を毎年施用していることから、その鶏糞中にダイズ病害を抑制する微生物が存在すると推察した。そこで本研究では、当該乾燥鶏糞からダイズ黒根腐病を抑制する微生物の分離を試み、その分離菌株の利用について検討した。当該乾燥鶏糞を粉碎して滅菌水と混合し、PDA培地に塗布して25℃でインキュベートした。培地に形成されたコロニーから微生物を分離し、ダイズ黒根腐病*Calonectria ilicicola*との対峙培養を行った。その結果、ダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制する微生物を3菌株分離することに成功した。16S-rRNA遺伝子の塩基配列による同定を行った結果、2菌株が“*Bacillus subtilis*”、残りの1菌株が“*Bacillus amyloiquefaciens*”であった。それぞれの抑制菌株をLB液体培地で培養し、培養液の混合液をダイズ黒根腐病菌汚染土壌に接種してダイズ（品種リュウホウ）を人工気象器内で栽培した。抑制菌を接種していないダイズは、生育初期からダイズ黒根腐病菌の病徴が発生して生育が著しく阻害されたのに対し、抑制菌を接種したダイズは病徴が現れず健全に生育した。このことから、分離した抑制菌3株はダイズ黒根腐病の発病を抑制する効果があることが明らかとなった。次に、それぞれの抑制菌株をLB液体培地で大量培養し、滅菌した鶏糞に混合してペレット（抑制菌資材）を作製した。この抑制菌資材をダイズ黒根腐病多発圃場に200kg/10a施用し、ダイズ（品種おおすず）を栽培した。三葉期では無施用のダイズは黒根腐病の病徴が確認されたのに対し、抑制菌資材を施用したダイズは病徴が見られなかった。収量は抑制菌資材施用区で約350kg/10aと、無施用区に比べて50%以上増収した。以上のことから、長期ダイズ連作圃場で施用されている乾燥鶏糞から分離したダイズ黒根腐病抑制菌は、ダイズ黒根腐菌の増殖を抑制し、圃場条件においても抑制菌の接種が防除に効果的であることが明らかとなった。

2016年夏、バグパイプに生えたカビによってアレルギー性疾患を発病したとの症例が報告された。以前、演者もアルトサックスの内部にカビ汚染があることを認めたことがある。管楽器は、唾が溜まったまま残るため、内部が湿っている可能性が高いと思われる。管楽器を演奏する時は息を吹き出すのであるが、連続して演奏する場合は、楽器の内部の空気を吸いこむ場合もある。今日では中高生にとって、吹奏楽クラブは人気のあるクラブ活動一つであり、カビ汚染が著しい場合には、健康上見過ごすことができないと思われる。これまでに楽器のカビ汚染の実態や、その原因について本格的な調査が行われたことは、著者の知る限りない。昨秋165台の管楽器について内部のカビ汚染を調べるために、拭き取り調査を行った。著しいカビ汚染が、ホルン、トロンボーン、トランペットなどの金管楽器にしばしば見られた。木管楽器に比べて金管楽器にカビが多いのは、クラリネットやフルートなどの木管楽器に比べて、水分が曲りくねった管の中に閉じ込められるために、管の内部が湿っていることが原因と思われた。管楽器内に生えるカビはいずれも好湿性のカビで、金管楽器ではPaecilomyces, Fusariumが多く、木管楽器では, Exophiala, Phomaが比較的多かった。金管楽器ではカビが多いので、胞子を大量に吸引した場合の健康被害について注意する必要がある。管楽器内部にスライム状の汚れが見られる場合は、カビだけでなく多くの細菌や酵母による汚染も見られた。また、管楽器の使用頻度が高い場合ほど、カビ汚染の多い傾向が見られ、演奏中に出る唾液などの水分要因が楽器内のカビ汚染を助長していることが窺われた。一方、金管楽器では、内部の掃除をほとんど行わない場合に、とりわけ中高生の楽器に汚染が多く見られた。スワブでふき取るだけの簡単な掃除でも、毎回するのが重要であることが分かった。また、内部をできるだけ乾燥するように工夫することが汚染予防に重要であると思われる。管楽器内で繁殖するカビについて見ると、いずれの金管楽器でもPaecilomucesとFusariumが優占し、その菌相に特徴があった。一方で、古い金管楽器にはしばしば緑青が見られた。そこで、金管楽器の材料である真鍮の材料である銅や亜鉛がカビ相に影響している可能性があると考え、金属のカビに対する影響についても検討を行った。

星野 仁彦¹, 深野 華子^{1, 4}, 吉田 光範¹, 鹿住 祐子², 近松 絹代², 藤原 永年³, 和田 新平⁴, 小椋 義俊⁵,
藤本 徳毅⁶, 水本 智咲⁷, 小泉 祐介⁸, 前田 浩義⁹, 平沼 修¹⁰, 石井 則久¹, 御手洗 聡², 林 哲也⁵, 阿戸 学¹

¹国立感染症研究所, ²結核研究所, ³帝塚山大学, ⁴日本獣医生命科学大学, ⁵九州大学医学部細菌学, ⁶滋賀医大皮膚科, ⁷大津赤十字
病院血液免疫内科, ⁸愛知医大感染症科/感染制御部, ⁹名古屋市立東部医療センター呼吸器内科, ¹⁰大津市民病院呼吸器内科

非結核性抗酸菌(NTM)は現在約170種類が知られており一般的に土壌や水中などの環境中に普遍的に存在するとされ、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類などのさまざまな動物種からも分離される。一部のNTMは今までの「常識」とは異なり条件によってはヒトからヒトに移ることもないと報告されている。2007年、滋賀県でホジキン病の既往のある細胞性免疫低下症例の皮膚結節病変よりNTMが分離され、その生化学的解析、multilocus sequence analysisの結果から、我々は2012年にこの分離菌を *Mycobacterium simiae* に近縁な新規のNTM "*Mycobacterium shigaense* "として報告した (*J Dermatol.* 2012;39:389-96)。その後 *M. shigaense* であると考えられるNTMが2011年に中国江蘇省で免疫が正常とされる女性の皮膚より第2例目が分離された(*Emerg Infect Dis.* 2013;19:819-20)。続いて、全身性キャスルマン病としてトシリズマブを使用された患者の皮膚病変より第3例目が分離され(日本内科学会雑誌 2016;105: 717-22)、第4例目は抗ウイルス治療開始後免疫再構築症候群として頸部リンパ節腫大とともに前胸部皮下腫瘤の増大がみられたAIDS患者のリンパ節生検組織や喀痰より検出された(*Internal Medicine* 2016;55 :3375-3381)。第5例目は愛知県の病院で間質性肺炎患者の皮膚病変より分離され、第6例目は肺NTM症疑いの気管支洗浄液から分離された。興味深いことに、これら6症例のうち4症例の患者は滋賀県の琵琶湖周辺に在住しており、異なる医療機関を利用していたことから、**琵琶湖を中心とした限られた地域における *M. shigaense* の流行の可能性が示唆された。**今回我々は、*M. shigaense* の病原菌としての特徴を把握するために、第1-6症例の菌株を収集して生化学的性状試験、薬剤感受性試験、multilocus sequence analysisを実施した。これら6症例の菌株はいずれも *M. shigaense* であることが明らかとなったが、中国および愛知県にて分離された2,5症例目の菌株と滋賀県において分離された4症例のものとは薬剤感受性及びmultilocus sequence に差異が認められた。近縁種 *M. simiae* との比較ゲノムを含めて発表する。

川井 真好, 迫谷 有希子, 通山 由美
姫路獨協大・薬

【目的】 *Staphylococcus aureus* は常在菌であるが、しばしば日和見感染を引き起こす。この *S. aureus* の易感染化メカニズムは詳細にはわかっていない。*S. aureus* の様々な外界からのストレスに対する防御機構の一例として、抗酸化活性を有するカロテノイド色素の産生が挙げられている。我々は *S. aureus* の環境因子である温度刺激をストレスとして培養温度の異なる *S. aureus* の生存性を検討したので報告する。【方法】菌株は、*S. aureus* ATCC12600を用いた。薬剤感受性は2倍寒天希釈法および2倍液体希釈法により測定した。バイオフィーム形成能はクリスタル紫による染色色素量により測定した。好中球モデルとして、ヒト白血病細胞株HL60細胞をall-trans retinoic acid (ATRA)処理により好中球様に分化して用いた。さらに、ヒト好中球を用いて検討した。好中球に対する *S. aureus* の抵抗性は、Soybean-Casein-Digest (SCD) 寒天培地を用いた生菌数測定により生残率を求めた。【結果および考察】 *S. aureus* を30～43℃で培養すると、黄色色素量が温度に依存して変化した。そこで、高温および低温で培養した *S. aureus* の薬剤抵抗性、バイオフィーム形成能を検討したところ、高温培養することにより高まった。続いて、好中球モデルHL60細胞に対する抵抗性を検討したところ、黄色の色素産生量の多い高温培養株が好中球への抵抗性を有していることがわかった。さらに、人工的なNETs形成誘導試薬PMAで好中球を刺激後、*S. aureus* を加えて生残率を解析した。高温培養株は、低温培養株より残存性が高かった。高温培養した *S. aureus* は、薬剤抵抗性、バイオフィーム形成能の向上、好中球による生体防御作用の一つであるNETs形成に対する抵抗性の寄与など生存能力を獲得していることが示唆された。この抵抗性の獲得を明らかにするため、分子メカニズムの解析を行う。

高安 伶奈¹, 須田 互^{1, 2}, 服部 正平^{1, 2}¹理化学研究所・統合生命医科学研究センター, ²早稲田大学・理工学術院先進理工学研究科

ヒト常在細菌叢は、体の部位ごとに大きく異なっており、局所的な状態やホストの細胞の生み出すシグナルに関連して変動していると考えられている。我々は唾液細菌叢の形成・変動がホストの恒常性維持にどの程度影響されているかを調べるため、比較的短期間でのサンプル採取が容易な口腔内唾液細菌叢の経時変動解析を行った。6名の健康者から4時間ごとに3日間採取した唾液から細菌叢DNAを抽出後、高速シーケンサーによる網羅的16S解析およびメタゲノム解析を行った結果、試験期間における同一時刻のサンプル間の菌叢構造の相違度は、他の時間帯のものよりも有意に低かったことから唾液細菌叢の概日周期的変動が明らかとなった。また、独自に開発した周期判定法により、唾液細菌叢に含まれる菌属の68.4~89.6%が、24時間の周期で変動していることを見出した(Takayasu et al., 2017)。存在比率の高い菌属の多くは、個人間で共通した概日増減パターンを示したが、一部の菌属においては、概日周期をもちながら、そのパターンが個人毎に異なった。概日リズムはホストから分離して培養すると、周期性が消える一方、食事を摂らない状況下での唾液細菌叢では、主要な菌の周期性は失われなかった。これらのことから、ヒト唾液細菌叢の概日リズムは、食事や菌同士の相互作用ではなく、ホストに強く依存したものであることが示された。一方で、食事前後の唾液細菌叢の時系列データを詳細に追っていくと、食事が細菌叢に与える影響は食後およそ1.5時間で収束し、その変動幅も、概日リズムによる変動を上回らないことが明らかになった。また、食事内容や個人差、時間帯によらず、食事を開始後およそ一時間後に、特定の菌種群が、相対比率を増加させる傾向も発見した。これらの菌叢変動は、食事に伴うホストの生体マーカーと強く相関する可能性があり、現在は、そのメカニズムの解明を進めている。

佐藤 由也, 堀 知行, 稲葉 知大, Ronald R Navarro, 尾形 敦, 羽部 浩
産総研・環境管理

活性汚泥は100年以上世界中で水処理に利用されてきた微生物群集であるが、細菌、古細菌、真菌、原生動物など数千種以上で構成される複雑なコミュニティであるため、その性質については未解明な部分が多く残っている。一般に活性汚泥中では「細菌群が有機物を利用し、増えた細菌群を原生動物等が捕食する」という食物連鎖でバイオマスが維持されると考えられているが、その複雑さゆえ定量的な解析はほとんど報告されていない。一方我々は、他の細菌を捕食する捕食性細菌群が活性汚泥に一定量存在し、それらが貧栄養条件で増加することを見出している。このことは、汚泥中の食物連鎖が上述の様な一方通行ではなく、より複雑な相互作用を含むことを示している。本研究では、活性汚泥中で起きる捕食作用の実態解明を目指し、二つの栄養条件で培養した活性汚泥のメタトランスクリプトーム解析を行った。1 Lの活性汚泥を基質有り／無しの二条件で14日間培養したところ、基質有りの系では活性汚泥の増殖が確認されたが、基質無しの系では汚泥濃度が30%程度減少し、系内の活発な捕食作用が示唆された。そこで、鋳型ゲノムを必要としないde novo RNA-seqにより、活性汚泥中の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。rRNAの発現量に着目したところ、基質無しの系でのみ真核生物の相対存在量が増加しており（14%から37%）、貧栄養条件で原生動物等が高活性であることが示唆された。次にmRNAに着目すると、基質有りの系ではTCA回路酵素を含む多様な有機物代謝酵素が高発現していたが、基質無しの系ではそれらはほとんど発現していなかった。一方、基質無しの系では特異性不明の加水分解酵素やペプチダーゼが高発現しており、それらはほとんどが細菌由来のホモログであった。このことから、捕食性細菌群は貧栄養条件において、活性汚泥中の細胞残渣等を低分子に分解して利用していることが推察された。この他にもウィルスや独立栄養性細菌由来の遺伝子も高発現しており、貧栄養条件における、捕食作用だけではでない複雑な微生物間相互作用が垣間見られた。

査柳 智^{1, 2}, Ronald Navarro¹, 眞弓 大介³, 羽部 浩¹, 片山 葉子⁴, 高崎 みつる², 堀 知行¹
¹産総研・環境管理, ²石巻専修大, ³産総研・地圏資源, ⁴東京農工大

【目的】海底堆積物の蓄積は閉鎖海域で多く報告されている。一方で、東日本大震災の津波で大量の堆積物が陸上に打上げられ、開放系沿岸海域における堆積物蓄積の普遍性が明らかとなった。しかし、嫌気的な海水環境における堆積物分解メカニズムの多くは不明である。本研究では、硝酸塩添加による堆積物中の微生物群集構造と代謝活性への影響を次世代シーケンサー解析、分離培養および超高感度stable isotope probing (SIP) により明らかにした。

【方法・結果】初めに、堆積物を人工海水へ嫌気的に懸濁し、硝酸塩20 mMを添加して25°Cで5日間培養を行った。培養物からDNAとRNAを抽出し16S rRNA遺伝子を対象に次世代シーケンサー解析を行った。培養開始後、脱窒（硝酸の減少とN₂Oの生成）及び硫黄酸化（固相中の硫黄成分の減少と硫酸の生成）が観察され、*Sulfurimonas*属およびChromatiales目に属する微生物の相対存在量が劇的に上昇した。硫黄化合物と硝酸塩を基質とした限界希釈培養により、培養5日目に主要であった*Sulfurimonas*属および*Thioalkalispira*属の硫黄酸化細菌の分離培養に成功した。分離菌は脱窒能を有していたことから、これらの細菌群が堆積物中の脱窒と硫黄酸化に関与したことが示唆された。

次に、硝酸還元条件における堆積物中の微生物間相互作用を明らかにするため、¹³C標識重炭酸塩10 mMと硝酸塩20 mMを添加して21日間培養した堆積物に、超高感度SIPを適用した。その結果、培養経過に伴った¹³C標識微生物の変遷が観察された。培養4日目では、*Sulfurimonas*属、Chromatiales目の硫黄酸化細菌群が¹³Cを活発に取り込んだ微生物として検出された。培養9日目には、硫酸還元能を有する*Desulfobulbus*属や*Desulfocapsa*属細菌群の¹³C標識rRNAが検出された。一方、培養最終日において、¹³C標識されなかったものの、N₂O還元菌や、メタン生成古細菌などのrRNA発現の上昇が観察された。これらの結果から、硫黄酸化細菌群は堆積物中で¹³CO₂を固定して生育し、固定された¹³Cは硫酸還元菌群へと直接的に伝達されたことが示された。さらにこれらの生命活動の間接的な影響により、他の微生物群の代謝活性化が引き起こされたことが明らかとなった。

遠藤 直樹¹, 菅原 遼¹, 松下 範久², 早乙女 梢¹, 前川 二太郎¹, 中桐 昭¹¹鳥取大・農, ²東京大・院農

テングタケ属 (Amanita) はタマゴテングタケに代表される猛毒種に加え、タマゴタケに代表される優秀な食用種も多く含む有用な分類群であり、様々な研究に利用できる分離株の確立が望まれる。しかし、本属菌の大半は外生菌根菌に属するため分離・培養ともに困難であり、特に胞子分離の成功事例は一部の種に限られる。一方、一部の本属種はMNC寒天培地（以下、MNC培地）を用いると組織分離が可能であることや、一部の外生菌根菌種は、n-酪酸を添加した培地では、胞子発芽が促進されることが先行研究で明らかとなっている。そこで、本研究では、テングタケ属の胞子分離におけるn-酪酸を添加したMNC培地の有用性を検討するとともに、本属菌の胞子分離株を確立することを目的とした。国内よりテングタケ属の子実体7試料を収集し、肉眼的特徴と顕微鏡的特徴に基づきそれぞれタマゴタケ、キタマゴタケ、タマゴテングタケモドキ、ニオイドクツルタケ、コテングタケ、シロオニタケ、およびコタマゴテングタケと同定した。これらの子実体から無菌的に得た落下胞子を少量の滅菌蒸留水で懸濁し、MNC培地にn-酪酸を30 ppmを添加した培地（以下、nMNC培地）に塗布して20℃、暗条件下にて最大3か月間培養した。対照区として、n-酪酸を添加しないMNC培地も用いた。キタマゴタケでは対照区のみ実施した。胞子発芽により得た培養菌体はMNC斜面培地に移植して培養し、菌株とした。得られた菌株と分離源子実体はrDNA ITS領域のPCR-RFLPパターンを指標に同一性を判断した。本研究の結果、タマゴタケとコテングタケを除く5種の胞子是对照区で発芽し、それら5種の菌株を確立できた。得られた菌株は、分子解析の結果、いずれも分離源子実体と同一のRFLPパターンを示し、目的とする菌株であると判断された。それら5種では、過去に胞子分離の事例は知られておらず、初の成功である。胞子の発芽率や培養菌体の生長は、種間や培地間で異なり、ニオイドクツルタケの胞子はnMNC培地上でより高い発芽率を示したのに対し、タマゴテングタケモドキの胞子はnMNC培地上で発芽せず、またコタマゴテングタケでは、培養菌体の生長がnMNC培地上で阻害された。以上より、テングタケ属の胞子分離において、MNC培地の使用は有効だが、n-酪酸の培地への添加は、一部の種に対して逆効果であると判断された。

菅原 遼, 遠藤 直樹, 早乙女 梢, 前川 二太郎, 中桐 昭
鳥取大学農学部

カノシタ属 (*Hydnum*) は欧米を中心に子実体が広く食用利用されており、また樹木と外生菌根を形成し、共生する生態的に重要な分類群である。しかし、本属菌は子実体に細菌などが内在するため、組織分離が困難であり、有効な分離培養法が確立されていない。そこで本研究では、カノシタ属種について、担子孢子からの分離培養を試みた。Ohta (1984) は、菌根性きのこの孢子分離にn-酪酸が有効であると報告していることから、本研究ではカノシタ属種に対するn-酪酸の効果について検証することも目的とした。鳥取県内より、カノシタ属種の子実体10試料を収集した。子実体は肉眼のおよび顕微鏡的特徴に基づき、それぞれ*H. repandum*、*H. cf. repandum*、*H. minum*、*H. rufescens*、および*H. albomagnum*と同定した。これらの子実体から無菌的に得た落下孢子を少量の滅菌蒸留水で懸濁し、MNC寒天平板培地（以下、MNC培地）およびn-酪酸 30 ppm添加MNC培地（以下、nMNC培地）に塗布し、20℃暗所条件で最長3か月間培養した。*H. cf. repandum*では、寒天をゲランガムに代えたMNC培地（以下、GMNC培地）も用いた。発芽孢子より得た菌糸体はMNC斜面培地に移植して培養し、分離株とした。分離株と分離源子実体はrDNA ITS領域のPCR-RFLPパターンを指標に同一性を判断した。供試した10試料全ての孢子は、MNC培地およびnMNC培地で発芽し、それぞれの試料に由来する分離株を確立できた。分子解析の結果、分離株はいずれも分離源子実体と同一のRFLPパターンを示し、目的とする菌株であることが確認された。nMNC培地を用いた結果、*H. minum*と*H. cf. repandum*は、MNC培地よりも高い孢子発芽率を示したが、他のカノシタ属3種では、孢子発芽後の菌糸生長が阻害された。また、*H. cf. repandum* は、GMNC培地において、MNC培地よりも高い孢子発芽率を示し、菌糸生長も他の培地に比べて良好であった。以上より、カノシタ属種はMNC培地を用いた孢子分離が可能であることが示唆された。また、本属では、培地へのn-酪酸添加により、孢子発芽率が高まる種がある一方で、菌糸伸長が阻害される種もあることから、n-酪酸は本属菌の分離培養において必ずしも有効ではないと判断された。

駒 大輔¹, 渡辺 嘉¹, 山中 勇人¹, 森芳 邦彦¹, 山崎 昌男², 大本 貴士¹¹阪技術研, ²オイケム合同会社

チロソールは高い抗酸化作用を持つ化合物として注目されており、サプリメントや医薬品原料としてだけではなく、コンタクトレンズのUV吸収剤の原料にも利用されている。天然のものは非常に高価であるため、主に化石資源由来のものが流通しているが、その価格は数千円/kgであり決して安くはない。化石資源由来のチロソールは恒久的なものとはなりえないことから、再生可能な糖質資源からチロソールを高生産することを目指した。そのための手法のひとつとして、「糖質原料からチロシンを生産する菌株（取得済み）」と「チロシンからチロソールを生産する菌株」とを組み合わせた二段階発酵法により、チロソールを糖質資源から効率良く生産可能であると考えた。そこで大腸菌の代謝改変を行い、チロシンからチロソールを合成するためのエールリッヒ経路（アミノ酸の脱アミノ化、ケト酸の脱炭酸、およびアルデヒドの還元からなる経路）を構築することを試みた。エールリッヒ経路構築のための3種類の遺伝子をT7プロモーターに連結し、大腸菌の染色体に順次導入した。はじめに、*Azospirillum brasilense*のフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*ipdC*)を導入した場合には、チロシンからのチロソールのモル収率は5%であった。つぎに、*ipdC*遺伝子に加えて、アルデヒドリダクターゼ遺伝子(*yahK*)を導入した場合には収率は50%に改善した。最終的に、この株のフェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*feaB*)を欠失させた上で、芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子(*tyrB*)を導入して完全なエールリッヒ経路を構築した場合には収率はほぼ100%に達した。培養温度を変えてチロソールの生産について解析したところ、37°Cで培養した時にチロソールの生産速度が大きく、OD₆₆₀が1.0程度の菌液を用いた場合に8時間で2mMのチロシンをほぼ完全にチロソールへと変換した。

今林 彩花¹, 前田 憲成¹, 城崎 由紀², Susana Neves²¹九工大・院生命体, ²九工大・院工学

【背景・目的】世界のエネルギー事情は、依然化石資源に依存している状況であるが、温暖化ガス発生の削減と将来の低炭素化社会の実現には、石油に代わる資源となりうる水素ガスなどの次世代エネルギーを効率的に生産する技術確立が必要がある。当研究室では低コストが期待できる生物学的手法に着目し、細菌が持つ水素発酵の機能を遺伝子工学的に高める研究をこれまで進めてきた。最近、キトサン複合体材料が細菌の活性を高めることが現象論でわかってきており、この活性化現象を利用して、水素ガスが高度生産されるのかを検証すること、ならびにその活性化現象を解明することを本研究の目的とした。【方法】本研究で使用した大腸菌は、親株BW25113、乳酸脱水素酵素欠損株(Δ ldhA)、6 遺伝子欠損水素高度生成株(Δ 6)であり、キトサン複合体ゲルあり、またはなしのバイアル瓶に、嫌氣的にグルコース含有LB培地およびそれぞれの菌の前培養液を接種し、37°C、120rpmで24時間嫌気発酵を行った。キトサン複合体ゲルは、はじめに塩酸にキトサンを加えキトサン溶液を作製し、そこにGPTMS((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan)と β -GP(β -Glycerophosphate disodium salt hydrate)を加えることで、バイアル瓶中に作製した。【結果】24時間後のゲルサンプルにおける水素発生量は、ゲルなしのサンプルに比べ顕著に高いことが確認された。その詳細な分析を行ったところ、ゲルサンプルではグルコースの消費量が高く、それに伴い、代謝活性が上がり、有機酸を多く生成していることがわかった。この結果に相関して、ゲルサンプルにおける菌液の濁度も増加していたものの、生菌数は低下するという矛盾する結果となった。また、顕微鏡による菌液の観察により、ゲルサンプルの中では、菌同士が凝集し、死滅している様子が観察された。最終的には、GPTMSと β -GPが菌の活性化の1要因であること、およびキトサンが菌の不活性化に関わっていることがわかった。

上田 朋美, 河野 響, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
東京大・生物工学セ

【背景】プラスミドは細菌間を水平伝播し宿主に新規形質を付与する一方で、その形質が有利に働かないような条件下では宿主に負荷を与えることも知られている。当研究室でも、*Pseudomonas resinovorans* CA10株が保持していたカルバゾール分解プラスミドpCAR1 (IncP-7) を3種の*Pseudomonas*属細菌 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) に保持させた際に負荷が生じることが示された [Takahashi *et al.*, 2015]。一方で、CA10株からpCAR1を脱落させたCA10dm4株ではpCAR1保持に伴う負荷が認められず、さらにトルエン分解プラスミドpWW0 (IncP-9) を保持させても負荷が認められなかった。本研究ではこの現象に着目し、様々なプラスミドおよび人工ベクターを用いてこの現象の一般性を評価した。【方法・結果】プラスミド保持に伴う負荷の定量を、プラスミド保持株と非保持株を等量混合したものを非選択条件下で継代共培養し、経時的に両者の比率を測定するcompetition assayによって行った。不和合性群やアクセサリ遺伝子の特徴（薬剤耐性や分解性）が異なる6種のプラスミドを用いた結果、いずれの場合も共培養の過程でプラスミド保持株の比率はほぼ変動せず負荷が認められないことが明らかになった。なお、採用した実験条件下での接合伝達と、薬剤等を含まない非選択条件下でのプラスミド自体の脱落の影響は無視できる程度であった。以上より、CA10dm4株はプラスミドの特性に関わらずプラスミド保持に伴う負荷を受けない株であることが示された。次に、汎用性の広宿主域ベクターpBBR1MCS-5を用いて評価を行った。このプラスミドベクターは、KT2440株とCA10dm4株のいずれに保持させた場合も非選択条件下での培養時に脱落は5%以下の細胞でしか見られず安定に保持された。一方、非保持株と混合したcompetition assayにおいては、培養開始時に約50%であったベクター保持株の比率がKT2440株では48時間の培養後に4%程度まで低下したのに対し、CA10dm4株では一定に保たれた。この結果は、CA10dm4株を宿主とした場合にはベクター脱落株が生じた場合でも集団からのベクター保持株の淘汰が起こらない可能性を示唆している。一般にベクターを用いた物質生産は選択条件下で行われるが、この結果からCA10dm4株は選択圧を必要としない物質生産に適した宿主である可能性が考えられる。複製起点の異なるベクターを用いた結果も併せて報告する。

持丸 華子¹, 眞弓 大介¹, 玉木 秀幸², 山本 京祐², 吉岡 秀佳¹, 鈴木 祐一郎¹, 坂田 将¹, 鎌形 洋一²¹産総研・地圏資源, ²産総研・生物プロセス

メタンガスは都市ガスの主成分であり、燃焼時に硫黄酸化物や窒素酸化物を生成しないクリーンなエネルギー資源である。商業的に重要とされる、世界の油ガス田等の貯留メタンの少なくとも20%は微生物活動により生産されたと見積もられている。近年、世界各国で開発が進められている石炭層に存在するコールベッドメタンでは、微生物の寄与が高いとされるものも報告されている。しかし、コールベッドメタンの形成について、その詳しいメタン生成メカニズムは明らかではない。石炭は主に植物のリグニンに由来する有機物からなり、その高分子構造内にはメトキシ芳香族化合物が含まれている。本研究では石炭からのメタン生成機構を解明するため、石炭の構成成分であるメトキシ芳香族化合物からメタンを生成できる微生物について探索を行った。その結果、メタン生成古細菌 *Methermicoccus shengliensis* が、多様なメトキシ芳香族化合物からメタンを生成することを発見した (Science, 354, 222-225 (2016))。 *M. shengliensis* の基準株 ZC-1 株で34種類、我々が深部地下圏から分離した同種の AmaM 株で35種類のメトキシ芳香族化合物からのメタン生成を確認した。 *Methermicoccus* が属する *Methanosarcinaceae* 目の他の9属のメタン生成古細菌についてもメトキシ芳香族化合物の利用性を調べたが、明確な利用は見られなかった。メタン生成代謝経路に関しても、AmaM 株や ZC-1 株は、既知の経路（基質の種類に対応して①二酸化炭素還元経路、②酢酸分解経路、③メチル化合物分解経路の3種）とは異なる様式でメトキシ芳香族化合物からメタンを生成することが示唆された。さらに、AmaM 株は単独で褐炭や亜瀝青炭、瀝青炭などの石炭からメタンを生成した。実際にこれらの石炭入りの培地中に数種類のメトキシ芳香族化合物が溶出することを確認した。メトキシ芳香族化合物は石炭だけでなく、有機炭素濃度が低い通常の堆積物・堆積岩にも広く含まれているため、この新規メタン生成機構は、コールベッドメタンを含む地下の天然ガス資源の形成に地球規模で貢献している可能性がある。

佐々木 祥平, 南澤 究, 三井 久幸
東北大・院生命

根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* はアルファルファ（マメ科植物）に根粒形成を誘導し、その細胞内で窒素固定を営む α -プロテオバクテリアである。*S. meliloti* が有する RpoH (σ^{32}) タイプのシグマ因子 RpoH1 は、ヒートショック応答と共生窒素固定の両方に必須の役割を果たす。RpoH1 の制御下にある遺伝子の一つ *sufT* は、機能不明であるものの、鉄・硫黄 (Fe/S) クラスター形成装置をコードする *suf* 遺伝子群の中に位置し、また、その相同因子は原核生物と真核生物の両方に広く存在している。我々は、当遺伝子の破壊（欠失変異）株において、鉄キレーター-dipyridyl への感受性上昇、最小培地での増殖速度の顕著な低下、6-ホスホグルコン酸脱水酵素等の Fe/S 酵素活性の低下、および共生窒素固定能の欠損といった表現型を見出した。次に、最小培地での増殖速度を指標にして *sufT* 変異株のサプレッサー変異株を分離し、そのゲノム解析を行ったところ、解析3株いずれにおいても、包括的 Fe 制御因子をコードする *rirA* の ORF 内に欠失変異を見出した。改めて *rirA* を破壊して *sufT rirA* 二重欠失変異株を作製し、表現型解析に供したところ、最小培地において野生株と *sufT* 変異株の中間的な増殖速度を示し、また、野生株と同レベルの 6-ホスホグルコン酸脱水酵素活性および共生窒素固定能が確認された。以上の結果は、細胞内の過剰な酸化ストレスを回避するために RirA によって維持されている低 Fe 濃度条件に抗するべく、SufT が効率的な Fe/S タンパク質の生合成に働いていること、シグマ因子 RpoH1 は、SufT の発現制御を通じて、変化に富む根粒菌の生活環を支えていることを示している。

辻野 修平¹, 上松 千紗都², 道羅 英夫³, 藤原 健智¹¹静岡大院・総合科学, ²静岡大・理, ³静岡大・グリーン研

硝化とは、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。独立栄養硝化菌については、生態学的、生化学的な研究が活発に行われている。一方、従属栄養的な硝化については、土壌環境中での窒素サイクルや、好氣的脱窒との共役による汚水浄化への応用という面で重要であるにも関わらず、その生化学的なメカニズムさえ統一した理解に至っていないのが現状である。従属栄養硝化菌には、非ヘム鉄を補欠分子族とするHAO (hydroxylamine oxidoreductase) を持つグループが報告されている。このタイプの従属栄養硝化菌では、独立栄養硝化菌と同様な経路で硝化が行われるものと考えられている。一方、ピルビン酸オキシムを中間代謝産物とする硝化経路を持つ従属栄養硝化菌も存在する。この反応の鍵酵素であるPOD (pyruvic oxime dioxygenase) が *Alcaligenes faecalis* から精製され、二価鉄を活性中心とする酵素であることが示されている (Ono *et al.* 1999)。今回、我々はこの酵素の性質について再検討を行い、PODは、亜鉛結合モチーフを持つClass II Aldolaseの相同タンパク質であるという興味深い事実を見出した (Tsujino *et al.* 2017)。また相同性検索の結果、多くの微生物にPOD遺伝子が存在することが明らかとなった。組み換え体を用いた分析から、PODは分子量約30,000のサブユニットからなるホモ4量体であり、1サブユニットあたり鉄1原子を含むことが確認された。また酵素活性には二価鉄を要求するがマンガンによる再構成も可能であり、6.5%のPOD活性を示した。基質親和性 K_m は 0.47 mM (ピルビン酸オキシムに対して)、また反応速度定数 V_{max} は 4.69/sec (/subunit) と決定された。POD活性はKCNによって阻害され、 IC_{50} は 0.4 mM だった。また亜鉛や鉄などの2価遷移金属イオンによって再構成したPODはFBP Aldolase活性を示さなかった。二価鉄を活性中心とするジオキシゲナーゼであるcatechol 2,3-dioxygenaseの反応機構や、PODと最も相同性の高い機能既知のAldolaseであるFucAの結晶構造を基に推定したPODの立体構造モデルを用いて、PODの反応機構について議論を行った。

楠田 瑞穂, 寺下 隆夫, 上田 光宏
大阪府立大学

【目的】バカマツタケは、マツタケの近縁種でマツタケよりも小型の子実体を形成し、ブナ科の広葉樹を宿主にしている菌根形成きのこである。この子実体ではマツタケよりも強いマツタケ香を生成する。香りの主成分はマツタケオールと桂皮酸メチルである。しかし、菌糸体では、マツタケオールの生産は認められるが、桂皮酸メチルは生成されないとされてきた。ところが最近、演者らは培地中にフェニルアラニン (Phe)を添加して培養すると、菌糸体でも桂皮酸メチルが生成される事を明らかにし、その結果の一部は、既に昨年の日本きのこ学会大会で発表した。今回は香氣成分生成の結果が少しまとまったので報告する。【方法】供試菌は、大分県で採取・分離したバカマツタケを用いた。培地は川合合成培地を基礎とし、そのN源をポリペプトン、L-Pheに変え、調製した。一定期間培養し、培養10日ごとに生産される香氣成分（桂皮酸メチル）を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と官能検査で確認した。【結果】本培地でのバカマツタケ菌の生育は非常に遅かった。しかし、培養10日目頃から桂皮酸メチルの生産が確認された。この桂皮酸メチルの生成量はバカマツタケの Phe 添加培地で最も多く、最大で $1500\mu\text{g}/\text{flask}$ 近くに達した。一方、ポリペプトン添加培地での生成量は低値であった ($100\mu\text{g}/\text{flask}$)。本菌での香氣成分の生成は、菌糸体がまだ殆ど生育していない培養10日目から既に確認される事から、変換酵素（PAL）が早くから生産されている事が想定され、マツタケ香氣成分の大量生産に興味が持たれる。なお、本菌におけるPAL酵素の生産と、他のバカマツタケ菌株の桂皮酸メチル生成についても検討中である。

植物病原糸状菌は植物細胞壁多糖の分解に関わる様々な菌体外酵素を産生する。これにより宿主組織の侵蝕と栄養利用を行うだけでなく、得られた分解物に応答して様々な生理調節を行う。本研究では、植物細胞壁多糖の分解物として得られる五炭糖類が病原糸状菌に及ぼす生理作用について調査した。

植物細胞壁の非セルロース多糖（キシラン、ペクチンなど）を加水分解すると、五炭糖であるキシロースおよびアラビノースが得られる。トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* においてキシロース・アラビノースの代謝を担う酵素 xylulokinase の遺伝子を欠損させたところ、欠損株はキシロースまたはアラビノースの存在下で生育が著しく制限された。ここに代替炭素源としてグルコースを加えても生育が部分的にしか回復しなかったことから、単にキシロース・アラビノースが炭素源として利用されないだけでなく、キシロース・アラビノース代謝物の滞留または蓄積に起因して、糖代謝の障害が生じている可能性が示唆された。当欠損株について、グルコース異化経路（解糖、ホスホグルコン酸経路）のフラックス決定に関わる酵素の遺伝子発現量を調べたところ、キシロース処理区およびアラビノース処理区ではホスホグルコン酸経路の顕著な活性化（glucose 6-phosphate dehydrogenase 遺伝子の発現増加）が見られた。グルコース処理区ではこのような作用が見られなかった。野生型株について同様の試験を行ったところ、アラビノース処理区でのみホスホグルコン酸経路の穏やかな活性化が見られた。ホスホグルコン酸経路は NADP^+ を電子受容体にして NADPH を生成する異化経路であり、一部の同化反応や活性酸素種生成に必要な還元力を供給している。上記結果より、アラビノース存在下ではグルコース異化による NADPH 産生が遺伝子転写レベルで活性化されることが示された。また、当活性化作用はキシロース・アラビノース代謝経路の阻害（xylulokinase 欠損）により強化されることが示された。

小西 正朗¹, 加藤 勇太¹, 石田 奨¹, 荒川 知子¹, 堀内 淳一²¹北見工大・バイオ環境, ²京都工繊大・院機能物質

リグノセルロース系バイオマスのひとつであるコーンの芯(corn cob)を硫酸処理後酵素糖化してえられた糖化液中で、良好に増殖する酵母の分離を試みたところ、KS47-1株を分離できた。系統解析、生理性状試験の結果からKS47-1株は*Pichia membranifaciens*に属する株であることがわかった。各種阻害成分が増殖に与える影響を調査したところ、酢酸に対して顕著な耐性を持っていることがわかった。本菌株は350 mMの酢酸塩存在下でも良好な増殖能を示した。また、好気条件で培養した場合、グルコースよりも酢酸を優先的に消費し増殖する特殊な炭素源の要求性を示すことがわかった。好気嫌気二段階培養により、250 mMの酢酸存在下でもエタノールを生産できた。Illumina HiSeqを用いドラフトゲノム解析した結果、実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae*で見られる酢酸関連シグナルタンパク質(HOG1やHAA1)遺伝子や酢酸取り込みに関与しているアクアグリセロポリン(FPS1)遺伝子と相同性の高い配列が認められず、酢酸排出に係わる膜輸送体(PMA1, PDR12, TPO2, TPO3)に相同性の高い配列が見出された。さらに酢酸代謝の第一ステップと思われるacetate CoA synthase ACS1と相同性の高い配列が見出された。これらの遺伝子産物はKS47-1株の特異な酢酸耐性に影響しているものと思われる。本菌株の糖化液中での増殖特性は、ロバストなバイオ燃料生産プロセスやバイオリファイナリープロセスに適用できるセルファクトリー(宿主)として利用できる可能性がある。

志野 遼太郎¹, 早乙女 梢², 遠藤 直樹², 前川 二太郎², 中桐 昭²¹鳥取大・院持続性社会創生科学, ²鳥取大・農

担子菌門の無性世代の一つに*Spiniger*型アナモルフがある。同アナモルフを持つ担子菌の系統樹上での分布を調査した結果、ベニタケ目の中で*Dichostereum*属と*Bondarzewia*属・*Heterobasidion*属近辺の2ヶ所の離れた系統に集中した。また、*Heterobasidion*属は宿主への菌糸の接触と担子胞子の分散による感染が知られているが、分生子の役割は未だ不明確である。そこで本研究では、*Bondarzewia*属・*Heterobasidion*属近辺の種で同アナモルフを持つ菌群の系統位置を解明し、その分類形質としての有用性を評価すること、同アナモルフが持つ性状を解明し、その生態学的意義を検証することを目的とした。本研究では同アナモルフを持つ可能性がある、主にFMRCに保存されている27菌株を供試し、MA・CMA・PCA培地で培養後、微分干渉顕微鏡でアナモルフの有無を調査した。また、培養菌糸からDNA抽出を行い、nrDNAのITS・LSU領域の塩基配列を決定後、近隣結合法と最尤法で系統解析した。次に、同アナモルフの生態学的利点として2つの仮説（コロニー拡大効率の向上と遺伝的多様性の増加）を立て、その検証を試みた。前者は分生子の分散試験と走査型電子顕微鏡での観察で、後者はDAPI染色した分生子や菌糸の核の観察で検証した。*Heterobasidion*属5種の培養菌糸で同アナモルフを観察できたが、文献では同アナモルフを持つとされる*Dichostereum*属と*Bondarzewia*属の種では観察できなかった。この内、*Bondarzewia*属は厚膜胞子を形成したが、*Heterobasidion*属では観察されなかった。また、*Heterobasidion*属は表面が平滑な分生子を形成したが、*Bondarzewia*属の種は文献では有刺性の分生子を有するとされていることから、アナモルフの形質を属の特徴として認識できる可能性がある。加えて、*H. annosum*の培養菌糸から異形の分生子が観察され、種の分類形質としての有用性が示唆された。系統樹とアナモルフの分布から、*Heterobasidion*属・*Bondarzewia*属・*Laurilia*属・*Echinodontium*属が一つの系統として分化し、同アナモルフの形成能を獲得後、*Echinodontium*属が二次的に同アナモルフの形成能を失ったと考えられる。同アナモルフの生態学的意義に関しては、分生子の分散方法は風媒であり、その核数は2核で、菌糸と核相が同一である可能性が高い。特に日本の*Heterobasidion*属種は子実体形成が稀なことから、大量の分生子をつくり、コロニー拡大効率を高めていることが推察される。

荒木 健佑¹, 山岡 裕一², 前川 二太郎³, 中桐 昭³, 早乙女 梢³¹鳥取大・院持続性社会創生科学, ²筑波大学生命環境系, ³鳥取大・農

Gloeocystidium ipidophilum Siemaszko (ハラタケ綱タマチョレイタケ目) は北欧に分布し、タイリクヤツバクイムシ (*Ips typographus*) の形成する坑道内に生育する担子菌である。本種は粒状で極小の子実体 (径1~5 mm), 1~2胞子性の担子器、楕円~倒卵形の担子胞子を形成し、グレオシスチジアを有することで特徴付けられる。日本国内においては、カラムツヤツバクイムシ (*I. subelongatus*) やヤツバクイムシ (*I. typographus japonicus*) の坑道から本菌の類似菌 (“*G. ipidophilum*”) が採集されている。本研究では日本産 “*G. ipidophilum*” の分類学的検討と生物学的特徴づけを目指し、分子系統解析、形態的特徴や核相の調査と交配型の決定を試みた。本研究には、長野県および北海道産の “*G. ipidophilum*” 3菌株を用いた。培養菌体上に形成された子実体の形態的特徴を観察し、*G. ipidophilum* の原記載と比較した。その結果、両者に差異は見られなかったが、GenBankに唯一、登録されているノルウェー産本菌のmt-SSU領域のDNA配列を日本産 “*G. ipidophilum*” のものと比較したところ、それらの相同性は98 % (520/533) であった。核LSU領域に基づき分子系統解析を行った結果、日本産 “*G. ipidophilum*” はハラタケ目タマバリタケ科 *Cylindrobasidium* 属のタイプ種を含む3種とともに高い支持を持つ単系統群を形成し、これらと近縁であることが明らかとなった。単胞子分離菌株の中からクランプ結合を欠く一核菌糸株を選抜し、交配試験を実施したところ、二極性ヘテロタリズムであることが明らかになった。その一方で、単胞子から発芽した菌糸には、隔壁にクランプ結合を有し、さらに培養菌体上に子実体や担子胞子を形成するものも確認され、また、核相調査から日本産 “*G. ipidophilum*” の担子胞子には1~8核が含まれることが観察されたことから、本種は二次的ホモタリズムの性質も有することが示唆された。これらの性質は、日本産 “*G. ipidophilum*” がクイムシの坑道という閉鎖的な生育環境において、単独で効率よく遺伝的に多様な個体を産出するために有すると推測される。今後は、北欧産 *G. ipidophilum* や近縁種を合わせた更なる検証を行い、日本産 “*G. ipidophilum*” の分類学的所属を決定するとともに、生活環における核行動の全容を明らかにする予定である。

的崎 利規¹, 服部 力², 中桐 昭³, 前川 二郎³, 早乙女 梢³¹鳥取大・院連農, ²森林総研, ³鳥取大・農

ウラギンタケは子実体が無柄、傘表面が黄褐色でピロード状の毛を有し、傘肉が橙褐色、孔口が黄褐色で光沢を帯びることによって特徴づけられる白色腐朽性の多孔菌であり、本州の暖温帯を中心に分布し、特に西日本では一般的な種である。本種は安田（1913）によって *Polyporus radiatus* として報告され、後に *P. neaniscus* (= *Coriolus neaniscus*) と修正されたが（安田 1915）、これらはいずれも誤同定である。一方、Lloyd（1915）は安田の標本に基づいて本種を *P. subradiatus* として新種記載した。しかし、本種の系統的な位置づけを考慮した詳細な分類学的検討は行われていない。そこで、本研究では形態学的な検証や複数遺伝子領域に基づく分子系統解析による本種の分類学的検討を行った。詳細な形態観察の結果、本種は以下の様に特徴づけられた。子実体は一年生、無柄、重生する；傘は半円形～腎臓形、傘表面は黒褐色、褐色～淡黄褐色、明瞭な環紋を有し、黒色の殻皮を有し、ピロード状の毛に被われる；傘肉は革質～コルク質、橙褐色～明褐色、KOHで黒変する；孔口は円形～多角形、黄褐色～淡黄褐色で光沢を帯び、大きさは4–6個/mm；菌糸組成は3菌糸型、原菌糸はクランプ結合を有する；担子胞子は楕円形～円筒形、平滑、IKI-、大きさは4–5.5 × 2–2.5 μm ；傘表面の殻皮は互いに凝着し、水平方向に配列する菌糸によって構成される。ウラギンタケとタマチョレイタケ目21属29種を用い、ITS、LSUおよびRPB2領域による分子系統解析を行った。その結果、本研究で用いたウラギンタケ2株は *Coriolopsis* 属や従来 *Coriolus* 属として扱われてきた菌種とは近縁ではなく、2014年に新種記載され、中国中部の暖温帯域に分布する *Neofomitella polyzonata* と共に支持の高い単系統群を形成した。また、さらに、これらの種は *N. fumosipora* および *N. rhodophaea* (タイプ種) と単系統群を形成した。 *N. polyzonata* の原記載とウラギンタケを比較した結果、両種は形態的にも一致しており、同一種であることが明らかとなった。本研究の結果、ウラギンタケは *Neofomitella* 属に所属することが明らかとなり、また、 *N. polyzonata* は *P. subradiatus* の異名として扱われるべきであり、新組み合わせを提唱する必要性が示された。

玉井 裕, 相澤 桃子, 宮本 敏澄, 矢島 崇
北海道大・農学院

スギタケ属菌 (*Pholiota* spp.) は、ハラタケ目モエギタケ科の担子菌である。温帯を中心として世界中に分布しており、現在までに150種ほどが報告されている。また、ナメコを代表とする独特なぬめりを有する優秀な食用キノコとしてアジア諸国で親しまれている。北海道においては15種のスギタケ属菌の存在が知られているが、外国や本州産と形態的特徴が異なる同属菌が見つかっており、種の識別及び食用可否の判別に混乱が生じている。そこで本研究では、北海道内で採集したスギタケ属7種について形態観察とITSシーケンスを基にした分子系統解析を行い、北海道のスギタケ属菌について分類学的に再検討することを目的とした。43系統のITS領域の塩基配列解析の結果、読み取れたITS領域は447~718bpの範囲内であった。北海道産系統のみで作成した系統樹では、キナメツムタケ、チャナメツムタケ、ツチスギタケ、ナメコが種毎にクレードを形成したが、ヌメリスギタケとヌメリスギタケモドキは同一クレード内に混在していた。両種は形態形質において明確に区別されるが、分子系統関係においては混乱状態にあったため、今後交配試験により遺伝的關係を検討する必要があると考えられた。ツチスギタケとその近縁種との遺伝的關係を探るため、ツチスギタケ(北海道産6系統、外国産10系統、本州産6系統)、スギタケ、スギタケモドキのみの系統樹を改めて作成した。系統樹は3つのクレードに分かれた。クレードⅢは北海道産ツチスギタケとスギタケ、クレードⅣはスギタケモドキ、そしてクレードⅤは本州および北米産ツチスギタケで構成された。北海道産ツチスギタケと本州および北米産ツチスギタケ(*P. terrestris*)は系統樹上で離れて位置しており、別種である可能性が示唆された。

高島 昌子¹, Sira Sriswasdi², 杉田 隆³, 西村 祐貴¹, 遠藤 力也¹, 大熊 盛也¹, 岩崎 渉², 眞鍋 理一郎⁴
¹理研・BRC, ²東京大・理学系, ³明薬大・微生物, ⁴理研・CLST

【目的】 Trichosporonales目 (Tremellomycetes, Basidiomycota) は深在性真菌症や夏型過敏性肺炎の起因菌、油糧微生物、セロビオハイドロラーゼや β キシロシダーゼ等バイオマス利用に資する酵素産生菌など多様な菌を含む分類群である。ほとんどの種は菌糸型と酵母型の両方を有し、代表的な種である *Trichosporon asahii* は腸管に常在することも知られている。Siraらは本目の *Trichosporon coremiiforme* と *T. ovoides* において、2度独立にハイブリッドゲノムが生じ、その安定化に遺伝子の進化速度の低下や基本的な生命現象に関わる遺伝子の欠失が関わっていることを明らかにした (doi:10.1101/gr.205948.116)。またこれらを含む Trichosporonales目 24株、アウトグループ3株のオーソログ遺伝子を連結し、約230万塩基に基づく最尤系統樹を作成した。本研究では、多様な性質を有する本菌群のゲノムデータに基づく特性解析を行った。【結果と考察】 Trichosporonales目のうち、かつて *Trichosporon* 属と分類されていた *Apiotrichum* 属 (8株) *Cutaneotrichosporon* 属 (8株) *Trichosporon* 属 (5株) の3属について調べたところ、コア遺伝子数はそれぞれ4445、4045、4506で、このうち3519が3属のすべての種に共通であった。また、*Apiotrichum* 属のみが共通に有する遺伝子は27、*Trichosporon* 属のみが共通に有する遺伝子は263であった。本結果は、*Apiotrichum* 属および *Trichosporon* 属は共通遺伝子を用いての特徴付けが行える菌群であることを示している。特に *Apiotrichum* 属においては、属特異的な遺伝子を27まで絞り込むことができたので、これを用いて属を識別する表現型遺伝子セットを決定できると推定している。*Cutaneotrichosporon* 属については、本属の8株のみが共通に有する遺伝子は検出できなかった。本属のうち *C. guehoael* は、系統樹では他の本属の種と7系統枝を形成しないことがわかっているため、さらに解析を進めている。また、クラスター解析において、*Trichosporon inkin* および *Cutaneotrichosporon daszewskae* では本解析に用いた他の種で高度に保存されているオルソログ (クラスター) を多く欠損していた。*Trichosporon inkin* は白色砂毛症の起因菌で、*C. daszewskae* も皮膚からの分離である。欠損している遺伝子に共通性があるかどうかを調査中である。

田中 栄爾¹, 小坂橋 基夫², 北本 宏子²¹石川県立大学, ²農研機構

南極の塩湖から発見された担子菌酵母の *Pseudozyma antarctica* は、その後様々な植物表面、排水、海底堆積物などから分離されていた。本菌は、生分解性プラスチック分解能が高く、工業的に利用されているバイオサーファクタントである Mannosylerythritol lipids を産生する。近年、系統解析によってヒエ類の黒穂病菌 *Moesziomyces bullutus* と本菌が単系統群を形成することから、本菌の学名は完全世代不明のまま、担子菌門クロボキン科の *Moesziomyces* 属に転属されて *M. antarcticus* となった (Wang et al. 2015)。今回、石川県、岐阜県、福井県で採集したイヌビエの子房に孢子堆を形成する黒穂病菌のうち、従来 *M. bullutus* とされていた菌の黒穂孢子を発芽させ、酵母状生育する無性世代の菌株を得た。このイヌビエ黒穂病菌由来の酵母菌株の rDNA の塩基配列と炭素源の資化能などの生理学的特徴を解析したところ、その配列と特徴は *M. antarcticus* とほぼ一致した。また、rDNA に基づく分子系統解析では、イヌビエ黒穂病菌は既知の *M. antarcticus* と単系統群となり、*M. bullutus* とは異なる単系統群となった。すなわち日本のイヌビエ黒穂病菌の無性世代がこれまで知られていた担子菌酵母の *M. antarcticus* であることが明らかとなった。また、イヌビエ黒穂病菌由来の酵母菌株の生分解性プラスチック分解能や Mannosylerythritol lipids の生産能は既知の *M. antarcticus* 菌株と遜色がなかった。これまで *M. antarcticus* の菌株はスクリーニングによって見出されていた。今回、*M. antarcticus* の完全世代がイヌビエの黒穂病菌であることが明らかとなったことから、イヌビエの黒穂病菌を採集して黒穂孢子を発芽させることによって、遺伝的に多様な菌株を得られることが期待できる。

広瀬 節子, 松浦 克美, 春田 伸, 花田 智
首都大・院生命

好気性光合成細菌は光合成色素バクテリオクロフィルを持つ絶対好気性の細菌で、海洋、土壌、酸性坑内排水、高塩濃度の湖などいろいろな環境から分離されているが、淡水水系、特に河川からの分離例は少ない。系統的には α プロテオバクテリアに属するものがほとんどで、 β プロテオバクテリア、 γ プロテオバクテリアに属するものは少数のみ知られている。我々は多摩川上流の河床礫バイオフィームから14系統28株の好気性光合成細菌を単離した（Hiroseら2016）。その後単離した株とあわせて β プロテオバクテリアに属する4系統の好気性光合成細菌を保持しているが、これらは16S rRNA遺伝子塩基配列相同性が既知の種と97.09%から97.99%でいずれも新種の可能性がある。今回は、このうち最初に単離した β プロテオバクテリアW35株について新種提案の可能性を検討した。W35株は $0.7\text{--}1.0\mu\text{m}\times 1.4\text{--}2.2\mu\text{m}$ の桿菌で運動性はなかった。平板培地上に30°C、5日で直径1mmの薄ピンク色のコロニーを形成した。嫌気条件では照射下でも増殖が見られず、好気条件でのみ増殖した。871nmに*in vivo*吸収ピークを持ち、励起光照射により赤外蛍光を発することから、バクテリオクロフィルを含む光合成器官を持つと考えられた。10°Cから35°Cで増殖し、最適温度は30°C、pH7.0から9.0で増殖が見られ、最適pHは8.0であった。硝酸還元能を有した。近縁種は非光合成細菌の*Aquabacterium commune*で、本菌との16S rRNA遺伝子塩基配列相同性は97.88%であった。また、好気性光合成細菌*Aquicola tertiarycarbonis*とは97.31%の相同性であった。*Aquabacterium*属細菌と本菌とはコロニーの色（*Aquabacterium*属は透明、白またはクリーム色）、光合成器官の有無、エスクリン分解性（W35は+）の点で異なる。この属には6種が含まれるが6種は系統的な広がりが大きく、系統樹上で2つのグループを形成する。一方のグループは低温性(最適生育温度20°C)、もう一方のグループは中温性(同25-30°Cから30-37°C)なので、*Aquabacterium*属菌は2つの属に分けるのが適当と考えられる。W35は前者に近縁であるが、このグループの菌は運動性を持ち、細胞のサイズ(短径が $0.5\mu\text{m}$)と最適温度の点でW35株と異なっている。これらのことから、河床礫上から単離したW35株を β プロテオバクテリア、*Burkholderiales*目に属する新属新種の好気性光合成細菌として提案する。

武村 政春¹, Chihong Song², 望月 智弘³, 吉川 元貴⁴, Romain Blanc-Mathieu⁴, 緒方 博之⁴, 村田 和義²

¹東京理科大・理, ²生理研, ³東工大・ELSI, ⁴京大・化研

ミミウイルス (APMV) の発見以降、ミミウイルス科、マルセイユウイルス科、パンドラウイルス、ピソウイルス、ファウストウイルス、モリウイルスなど世界中で多くの「巨大ウイルス」がそれぞれの水環境から分離・報告されてきた。近年では、日本の水環境からもマルセイユウイルス科の一種トーキョーウイルス (1)、ミミウイルス科の一種ミミウイルス・シラコマエ (2) などが分離されてきた。これら巨大ウイルスは、その構造の複雑さや宿主生物との遺伝子関連性などから、真核生物の進化において重要な役割を演じてきたことが示唆されており (3)、現在多くの研究グループにより新たな巨大ウイルスの探索が精力的に行われている。その中で本研究では、北海道・定山溪温泉の底質泥から、これまでの巨大ウイルスとは異なる系統に属すると考えられるウイルスを分離することに成功した。底質泥のPBS懸濁液を孔径20 μm のろ紙でろ過後、さらに孔径1.2 μm のろ紙によるろ過を行い、*Acanthamoeba castellanii* に添加して、細胞変性効果を指標に96ウェルプレートを用いてウイルス画分のスクリーニングを行ったところ、*A. castellanii* をシスト化するウイルス (ここでは「OV」と表記する: Onsenから分離したVirusの意) の分離に成功した。OVは、*A. castellanii* に感染後、1日~2日で同細胞をシスト化することがわかった。シスト化した*A. castellanii*細胞は、洗浄により培養上清中のウイルス粒子を除去しても元の状態には戻らないことから、OVは不可逆的に*A. castellanii*を不活性化させることが明らかとなった。OVのクローニング後、クライオ電子顕微鏡による解析の結果、OVが正二十面体構造を有し、さらにカプシドの周囲に無数の刺状構造を有する粒子径200 nm前後の大型ウイルスであることが明らかとなった。また全ゲノム解析により、OVが381,277 bpの線状ゲノムを有しており、マルセイユウイルス科よりやや大きいゲノムサイズを持つことが明らかとなった (ゲノム解析の詳細については、本大会・吉川らの発表を参照)。現在、OVの三次元構造の詳細な解析、*A. castellanii*細胞内での生活環の解明、*A. castellanii*をシスト化するメカニズムの解明を行っている。文献(1) Takemura M. (2016) Microbes Environ. 31, 442-448.(2) Takemura M et al. (2016) Genome Announc. 4, e01378-16.(3) Takemura M et al. (2015) J. Mol. Evol. 81, 24-33.

吉川 元貴¹, Romain Blanc-Mathieu¹, 望月 智弘², Chihong Song³, 村田 和義³, 緒方 博之¹, 武村 政春⁴

¹京大・化研, ²東工大・ELSI, ³生理研, ⁴東京理科大・理

核細胞質性大型DNAウイルス（Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Virus: NCLDV）は、二本鎖DNAゲノムを持ち、真核生物を宿主とする大型ウイルスである。21世紀に入り、NCLDVに属するウイルスとして、ミミウイルス、マルセイユウイルス、パンドラウイルス、ピソウイルス、モリウイルスなど、複雑なゲノムを保持する新規巨大ウイルスの発見が続いており、その生態や進化における位置づけについて関心が高まっている。本研究では、北海道・定山渓温泉の底質泥からアカントアメーバの一種 *Acanthamoeba castellanii* を宿主とするウイルスを新たに分離し（Onsenから分離したVirusの意でOVと表記する）、ゲノム解析を行った（OVの分離、形態の詳細については、本大会・武村らの発表を参照）。PacBioシーケンサーにより解析された配列データをCanuによりアセンブルした結果、OVゲノムは全長が381,277 bp（G + C = 61.7%）の直鎖状二本鎖DNAゲノムであることが明らかになった。GeneMarkにより、443個のタンパク質遺伝子が予測され、DNA Polymerase B遺伝子などの数個の遺伝子にはイントロン様配列が含まれていることが明らかになった。また、tRNAscan-SEにより、tRNAは3個予測された。OVはマルセイユウイルス科よりやや大きいゲノムサイズを持ち、粒子サイズも大型（約200 nm）であることからNCLDVに属することが予想された。NCLDVに共通して保存されている遺伝子群（コア遺伝子）の存在を確かめた結果、NCVOG（NCLDV clusters of orthologous genes）で分類されている遺伝子を16個保持することが判明し、OVはNCLDVに属すると推定された。DNA Polymerase B遺伝子、Major capsid protein遺伝子、DNA packaging ATPase遺伝子の分子系統解析により、OVが既知のウイルスファミリーと進化的に極めて遠い関係にあることが明らかになった。また、アカントアメーバゲノムの配列解析（Maumus & Blanc, 2016）から存在が予想されていた未発見ウイルスグループにOVが近縁であることも示唆された。さらに、多くのOV遺伝子が *A. castellanii* ゲノム中の配列と高い相同性を示すことが分かり、宿主との間で遺伝子交換が行われていることが推測された。

高畑 陽¹, 伊藤 雅子¹, 片山 傳喜², 吉川 成志², 柴田 幸樹², 川原 成²¹大成建設・技術センター, ²東洋製罐グループホールディングス

【目的】トリクロロエチレンなどの塩素化エチレン類で汚染された地下水の浄化方法として、水素供与体となる有機物を帯水層に供給し、Dehalococcoides 属などの脱塩素細菌を活性化させる原位置バイオレメディエーション技術が国内で広く普及している。浄化には水溶性有機物を水に溶かして井戸から注入する方法が一般的に用いられている。しかしながら、水溶性有機物は短時間で分解が進むため、浄化効果を長期的に維持することが困難であり、浄化材を繰り返して注入する必要があった。比較的ゆっくりと分解して有機物を放出する徐放性材料として、生分解性樹脂であるポリ乳酸（PLA）が安全で汎用性が高く、コストが安い。しかしながら、PLAは嫌気的環境で分解速度が遅く、嫌気的環境を維持できない課題があった。本研究では、PEOx（ポリエチレンオキサレート）をPLAにブレンドした新規材料を徐放性浄化材料として検討した結果について報告する。

【試験方法】50mLの滅菌済みガラスバイアル瓶に、PEOxの配合率を変化させ粉末化したPLA樹脂を入れ、塩素化エチレン類で汚染された実汚染地下水でガラス瓶に空隙が生じないように満たした。ガラス瓶にpH緩衝剤、窒素源、リン源を添加後、トリクロロエチレンが終濃度で1.2mg/Lになるように添加し、20℃の恒温槽で静置培養した。定期的に各条件のバイアル瓶を1本ずつ開栓してVOCs、全有機炭素、溶存性有機炭素、Dehalococcoides 属菌数について測定した。また、PLAにPEOxを10%配合した樹脂（10%PEOx-PLA）を微粉末化して水に分散させ、塩素化エチレン類汚染帯水層（GL-2.5～GL-9m、砂層）に注入し、注入前後における地下水中のpH、全有機炭素、酸化還元電位、VOCs等について測定した。【結果】室内試験結果から、PLAにPEOxを配合することにより、PEOxの配合比率が高いほど、嫌気環境での地下水への有機物供給量が大きくなり、有用菌（Dehalococcoides 属菌数）が増加する傾向が示された。注入試験に用いた10%PEOx-PLAはジェットミルにより平均粒子径が約2μmまで微粉末化可能であることを確認し、分散剤を用いて注入液に均一に分散させることで既存の井戸から容易に注入でき、微粉末樹脂を広範囲の帯水層に供給可能であることを確認した。

村田 里美¹, 伊藤 虹児^{2, 3}, 高木 和広², 清家 伸康², 中野 武⁴¹国立研究開発法人土木研究所, ²国立研究開発法人農業環境変動研究センター, ³東京農業大学, ⁴大阪大学

これまでの研究では、*Sphingomonas* sp. N-9株がPCBsやOH-PCBsを分解すること、また分解後生成された代謝物が安全であることを明らかにした¹⁾。本研究ではOH-PCBsを用いて模擬汚染土壌を作り、N-9株を用いてバイオレメディエーションの検討を行った。初めに4OH-PCB2を付着させたセライト（5ppm）を土壌に添加し、N-9株を用いて分解試験を行った。その結果、4OH-PCB2は培養1日で完全に分解され、液体培養中で確認された代謝物と同様の4hydroxy-3chlorobenzoic acidが等量生成された。次に9種類のOH-PCBs（4OH-PCB2, 4'OH-PCB3, 4OH-PCB14, 2'OH-PCB25, 4'OH-PCB25, 4'OH-PCB30, 5OH-PCB34, 6OH-PCB35, 4'OH-PCB69）をセライトに吸着させ土壌に添加した模擬汚染土壌（total 10ppm）を作成し、N-9株によるバイオレメディエーションの検討を行った。その結果4OH-PCB2や4OH-PCB14は培養1週間で完全に分解され、5OH-PCB34と6OH-PCB35では 培養2週間でそれぞれ30%と33%分解することができた。一方4'OH-PCB25、4'OH-PCB30、4'OH-PCB69は液体培養中では20~40%分解できるが、土壌中では培養3週間でもほとんど分解がみられなかった。これらの結果からN-9株はOH-PCBsの種類により、土壌中のバイオレメディエーションに差がみられることが明らかになった。＊本研究はJSPS科研費 JP2640107の助成を受けた。¹⁾ Satomi Mizukami-Murata et al. "Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil", Chemosphere, 2016, 165: 173-182

加藤 広海, 大坪 嘉行, 津田 雅孝, 永田 裕二
東北大・院生命

我々は、環境を汚染する難分解性有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (HCH) 分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS株の単離源となった細菌コミュニティを対象に、実環境での環境細菌の「生き様」や相互作用に関する知見を得ることを目的として研究を進めている。TKS株は、単独ではHCHを唯一の有機炭素源とした無機固体培地上で生育するもののHCH分解に伴いコロニーが褐色化し分解活性が低下する。これに対して、TKS株を含むコミュニティでは不定型な大きなコロニーを形成し、分解活性を持続する。454およびIllumina MiSeqシーケンサーを用いて本コミュニティのメタゲノム解析を実施した。メタゲノムリード中の16S rRNA遺伝子を解析した結果、*Sphingobium*以外にも、*Cupriavidus*や*Pseudomonas*が存在し、これら3属でコミュニティの90%程を占めていた。さらに、メタゲノムの機能遺伝子の解析を行なった結果、HCH代謝の上流経路に関与する *lin* 遺伝子群はsphingomonads由来のものとはほぼ同一であったが、chlorobenzene等のHCH代謝産物および関連物質の分解遺伝子には様々な*Proteobacteria*由来と推定される遺伝子が含まれていた。さらに、メタゲノムリードのアセンブルの結果、TKS株のゲノム配列の解析から挿入配列IS6100の転移により組換えを起こす前の状態と推定された配列を有するコンティグが見出され、推定されたIS6100の転移によるゲノム再編成が実際に起こっていたと強く示唆された。一方、本コミュニティから単離し、メタゲノム解析の結果から同属の存在比率が高かった非分解菌の*Cupriavidus* sp. TKC株と*Pseudomonas* sp. TKP株の分解菌TKS株との関係性について解析を行った。滅菌土壌にこれら3株を単独で接種して経時的に菌密度を測定した結果、TKS株とTKP株は土壌に定着できなかったが、TKS株はTKC株と混合して接種することで定着可能となった。また、TKC株は固体培地上において、培地組成によって様々なコロニー形態をとり、一部の低栄養性培地でコロニーがより拡大する傾向が見られた。さらに、興味深いことに、TKS株と混合して固体培地に接種すると、TKC株はTKS株コロニーに向かって細胞増殖をする傾向を示し、TKC株が積極的にTKS株とコミュニティを形成する可能性が示唆された。

John Jewish Arellano Dominguez, Mei-Fang Chien, Chihiro Inoue
Tohoku University

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic pollutants with known risks to the environment. To remove PAHs in soil, grasses are often used due to its resistance to adverse environmental conditions. Grasses are reported to promote PAHs dissipation through enhanced microbial growth and activity in the roots. Despite this, little is known about the grass-bacteria interaction in PAHs stressed environment. In this study, to investigate the bacterial community shift in roots of grasses under PAHs stress, tall fescue (*Festuca arundinacea*) and sudangrass (*Sorghum x drummondii*) were grown in hydroponic culture spiked with PAHs mixture containing naphthalene, anthracene, phenanthrene and pyrene. The culture was either inoculated with PAH-degrading bacteria or not. Results suggest that with or without PAH-degrading bacteria, dissipation of naphthalene and phenanthrene up to concentration below the detection limit can be achieved. However, inoculation of PAH-degrading bacteria enhanced dissipation of anthracene and pyrene by up to 18% and 23%, respectively in sudangrass and up to 18% and 13%, respectively in tall fescue. Furthermore, the presence of PAHs and the inoculation of PAH-degrading bacteria independently induced a shift in the microbial community in the roots. The dissipation pattern of PAHs and the characterization of bacterial community shift are currently being done.

Le Thi Nhi Cong^{1,2}, Do Thi Lien¹, Nguyen Thi Minh Nguyet^{2,3}, Cung Thi Ngoc Mai¹, Hoang Phuong Ha¹¹Institute of Biotechnology-Vietnam Academy of Science and Technology, ²Graduate University of Science and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology, ³Hanoi Pedagogical University²

Ten purple photosynthetic bacterial strains were isolated from oil contaminated water and sediment samples taken from several coastal zones including Quangngai and Vungtau. Three of them, DQ41, DD4 and FO2, were capable of biofilm formation and aromatic hydrocarbon degradation. Under Scanning Electron Microscope (SEM) with 10,000 times of amplification, their cells are rod-shaped (from 1.1 to 2.2 μm in size). They can grow on some carbons such as acetate, succinate, malate, glycerol; but can't grow on some others including methanol, citrate, tartate and formate. These characteristics play important roles for their identification basing on System basic Bergey. Moreover, based on the morphological characteristics and sequence alignment of 16S rRNA encoding gene, three selected strains were classified to have a high sequence homology up to 99% with *Rhodopseudomonas palustris*. The three strains have ability to grow at phenol, toluene, naphthalene and pyrene concentration up to 150, 100, 300, 300 ppm, respectively. Efficiency of naphthalene degradation by biofilm formed by DQ41, DD4 were 97.71% and 97.23% with initial naphthalene amount of 300 ppm; of pyrene degradation by biofilm formed by DQ41, FO2 were 99.14% and 99.37% with initial pyrene amount of 250, 300 ppm, respectively. The aromatic hydrocarbon degradation of the biofilm-forming strains including sDQ41, DD4 and FO2 enhances our understanding of the capacity of these purple photosynthetic bacteria in biofilm type and give new insight into the potential role of such organisms in the degradation of other recalcitrant aromatic compounds.

倉澤 豊¹, 天知 誠吾¹, 堀 知行², 山村 茂樹³¹千葉大院・園芸, ²産総研, ³国環研

現在、ヒ素汚染土壌は封じ込めや掘削除去により処理されているが、土壌自体からヒ素を除去できないため、根本的な問題の解決には至らない。土壌中のヒ酸As(V)を異化的に還元する細菌は、鉄やアルミニウム鉱物に吸着しているヒ酸を、吸着性の低い亜ヒ酸As(III)に還元し液相に溶出させる性質を持つため、土壌中ヒ素の可溶化・除去技術への応用が期待されている。我々はこれまで、乳酸を唯一の炭素源とする無機塩培地、ヒ素汚染土壌、及び土壌懸濁液を混合し嫌気培養することで、*Firmicutes*門細菌の優占化と共に、ヒ素が溶出することを確認している。本研究では、より実用的な処理条件を確立するため、ヒ酸と塩化鉄の共沈殿物As(V)-Fe(III)、またはヒ酸と硫酸アルミニウムの共沈殿物As(V)-Alを用いたヒ素可溶化試験を行い、それぞれでヒ素溶出に関わる微生物およびヒ素溶出メカニズムの推定を試みた。土壌懸濁液を微生物植種源として添加し、炭素源として乳酸塩または酢酸塩を加え、嫌氣的に培養を行った。10日ごとにサンプリングを行い、ICP-AESによりヒ素及び鉄の全濃度、フェロジン法によりFe(II)濃度を測定した。乳酸塩を添加した条件下で、ヒ素溶出が最も促進され、As(V)-Fe(III)及びAs(V)-Alから約50%のヒ素が溶出された。また、Miseqを用いて16S rRNA遺伝子増幅産物のシーケンスを行い、得られたデータをMothur、QIIMEを用いたOTU(カットオフ値：97%の配列相同性)レベルでの系統解析に供した。その結果、乳酸塩を添加した条件で、発酵性の*Sporomusaceae*科細菌と異化的ヒ酸還元能を有する*Desulfitobacterium*属細菌の相対存在量が大きく増加し、これらの*Firmicutes*門細菌が全体の約60%を占めた。乳酸塩無添加の条件においても*Firmicutes*門細菌は全体の約30%まで上昇したが、*Sporomusaceae*科細菌の増加は観察されなかった。また、培養沈殿から単離した*Sporomusaceae*科細菌には共沈殿物As(V)-Fe(III)の還元能が確認された。以上より、乳酸塩添加によるヒ素溶出の促進には既知の異化的ヒ酸還元細菌のみならず、*Sporomusaceae*科細菌のような発酵性細菌も大きく関与する可能性が示された。

菅原 一輝, 鈴木 誠一
成蹊大・理工

ヒ素による健康被害は世界各地で大きな問題となっており、特に東南アジア地域では地下水の汚染により数千万人規模の被害が懸念されている。このようなヒ素の水・土壌の汚染に対し、植物を用いた環境浄化手法であるファイトレメディエーションが、安価かつ環境負荷も小さい手法として近年注目されている。ヒ素除染に適用可能な植物として、ヒ素を高濃度で蓄積可能なモエジマシダに関する研究は進められているものの、そのヒ素超蓄積能や耐性に関しての全容は明らかになっていない。モエジマシダのヒ素蓄積時の特徴的な外観の変化として、小羽片外周部の褐変が観察され、その部位にヒ素が高濃度で蓄積していることがこれまでの研究で判明している。その一方で、ヒ素耐性を持たない植物はヒ素曝露時に葉全体の白化が観察されることが多く、モエジマシダとは異なる生理現象を示している。そこで、本研究ではモエジマシダのヒ素蓄積時の植物内必須元素の挙動を調査することで、ヒ素の超蓄積能に関わる生理現象の検討を行った。また、必須元素間の関係をより明瞭にするために多変量解析を用いることで、ヒ素の蓄積に対する各元素の振る舞い及び関係性を整理した。モエジマシダは暴露したヒ素濃度が高くなるにつれて蓄積したヒ素濃度も上昇し、小羽片外周部の褐変も観察された。この時、植物体中のヒ素濃度に対してリン濃度は正の相関、ホウ素濃度は負の相関を示した。さらに、ヒ素及び必須元素11種類を対象としたクラスター解析の結果では、ヒ素とリンが同じクラスターに属しており、上記の相関関係の結果を支持するものであった。同様に12種類の元素を対象とした主成分分析では、寄与率の高い主成分の多くは通常の植物生理現象に関わると考えられたが、一部主成分中の必須元素の固有値は、ヒ素による葉緑体や植物体へのダメージを示唆する結果を示していた。以上より、多変量解析を用いることで植物体内における元素の関係性を明らかにし、生理学的意味合いを理解することが可能であると示された。

長嶋 彩乃, 孙 晓晗, 中杉 康仁, 宮本 寛之, 小林 肇
東京大・院・工・システム創成

バイオカソードとは、電気化学的な還元反応の触媒に微生物を利用した電極（カソード）である。電極の表面に定着している微生物が電極から供される電子を利用し、還元反応による化合物合成を触媒する。微生物の代謝能により、バイオカソードでは、電気エネルギーを極めて高い効率で利用し、CO₂から有機物（燃料など有用化合物）を合成できる。私たちは、社会の低炭素化への寄与をめざし、高性能のバイオカソードを開発し、その触媒機構の解明に取り組んでいる。好熱性微生物の能力に着目し、好熱菌を用いて数種のバイオ電極を構築した。その中で、油田の地下水を微生物源としたバイオカソードは、高い電気化学的メタン生産能を有し、反応の電子利用効率は96%以上、さらに高い電位（＝低い入力エネルギー）でのメタン生産が可能という顕著に有望な特性を示した。電気化学的解析から、同バイオカソードによる電気化学的メタン生成には、電子を直接受け取る直接的経路（CO₂ + 8H⁺ + 8e⁻ → CH₄ + 2H₂O）と水素分子を介する間接的経路（8H⁺ + 8e⁻ → 4H₂, CO₂ + 4H₂ → CH₄ + 2H₂O）の2つの反応経路が電位に依存してそれぞれ関与していることが示唆された。本研究では、電気化学的メタン生成反応の微生物的機構の理解を目的に、触媒能に関わるバイオカソード表面の微生物系の定量・定性的解析を行った。内部抵抗は、過電圧とエネルギーロスを引き起こす主要な要因であり、カソード性能の重要な指標である。インピーダンス分光法により、バイオカソードの内部抵抗を測定した。予想通り、高活性のバイオカソードは、低い内部抵抗を示した。走査型電子顕微鏡を用いてバイオカソード表面の微生物数の定量を行ったところ、大別して桿菌（Rod）と球菌（Coccus）の2種類の微生物が観察された。これら2種類の微生物密度と内部抵抗の相関を調べたところ、桿菌にのみ相関がみられ、この桿菌がメタン生成反応に寄与していることは示唆された。さらにバイオカソードのメタゲノムを解析したところ、メタゲノムの9割がActinobacteria門 Coriobacteriales目の新規の細菌種とメタン生成古細菌 Methanothermobacter thermautotrophicus 近縁種に由来するゲノム情報に占められていた。

齋藤 範三, 野村 俊之, 小西 康裕
大阪府立大・院工

本研究では、自動車用触媒、燃料電池電極触媒などの製造に不可欠な貴金属・レアメタルである白金族金属（白金、パラジウム、ロジウム）に着目し、これら白金族金属（PGMs）イオンに対して還元・析出機能をもつ*Shewanella*属細菌によるバイオミネラリゼーションについて紹介する。さらに、このバイオミネラリゼーションを利用する「希薄溶液からのPGMsイオンのバイオ分離・回収プロセス」、また「PGMsナノ粒子触媒のバイオ調製プロセス」を提唱し、その実用化可能性について検討する。

秀瀬 涼太¹, 豊田 真孝², 木村 成吾¹, Gita Adhirani Wihardja¹, 溝端 栄一², 井上 豪², 藤原 伸介¹
¹関西学院大院・理工・生命, ²阪大院・工・応化

【研究目的】ポリアミンはあらゆる生物の生命活動に必須である。好熱菌は一般的なポリアミンであるスペルミジン(SPD)等に加えて、長鎖または分岐鎖のポリアミンを有する。分岐鎖ポリアミンは、分岐鎖ポリアミン合成酵素BpsAの触媒作用により、脱炭酸化されたS-アデノシルメチオニン(dcSAM)をアミノプロピル基供与体として、SPDやノルスベルミジン(NSPD)より生成される。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はN⁴-ビス(アミノプロピル)スペルミジンを著量蓄積するのに対し、好熱性バクテリア *Thermus thermophilus* HB27株は、N⁴-アミノプロピルノルスベルミジン(ApNSPD)やN⁴-ビス(アミノプロピル)ノルスベルミジンなど3級及び4級の分岐鎖ポリアミンを同等の濃度でもつ(1)。本研究では、*T. thermophilus* BpsA(*Tt*-BpsA)及び*T. kodakarensis* BpsA(*Tk*-BpsA)の性質の違いから細胞内ポリアミンの組成の違いが生じる点を考察した。【結果と考察】*Tt*-BpsAは基質SPD、NSPD、N⁴-アミノプロピルスペルミジン(ApSPD)、ApNSPDに対して同等の触媒効率を有していた。*T. thermophilus* HB27株の分岐鎖ポリアミンの多様性は*Tt*-BpsAの性質に起因すると考えられる。この反応特性を調べるため、*Tt*-BpsA-ApSPD-メチルチオアデノシン三者複合体三者複合体のX線結晶構造を1.8 Åの分解能で決定した。*Tt*-BpsAは*Tk*-BpsAの活性部位の立体構造と類似していた。*Tk*-BpsAの場合、C末端領域のループ構造(基質を触媒活性部位に安定に保持するために必要)はGln340とThr350の側鎖の3.9 Åの水素結合で保持されているが、*Tt*-BpsAの場合、対応するアミノ酸残基(Gln346及びTyr353)が水素結合を形成していない。このため、このループ構造の可動のしやすさが、基質特異性の違いを生むと予想された。*Tk*-BpsAのGln340をAlaに置換した変異型酵素*Tk*-BpsA-Q340Aの反応速度論的解析を行った。*Tk*-BpsAの基質特異性(K_m)と比較し、Q340AではSPDに対して K_m が2倍以上減少(親和性増加)した一方、NSPD、ApNSPD、ApSPDに対して K_m が2倍以上増加(親和性減少)した。この結果は、*Tk*-BpsAのC末端領域のループの水素結合は基質結合ポケットの維持に関与し、基質との親和性を決定する要因であることが示唆された。このC末端領域のループの可動性の違いが、細胞内ポリアミンの組成の違いが生じる要因の一つと考えられる。【参考文献】(1) Hamana et al. J. Jpn. Soc. Extremophiles. 7, 10-20(2008)

澁川 匡史, 秀瀬 涼太, 藤原 伸介
関学大院・理工・生命

【目的】 ポリアミンとは様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (生育至適温度：85°C) は、一般的な直鎖のポリアミンであるブトレスシン [4] やスベルミジン [34] の他に分岐鎖のポリアミンである N^4 -ビス(アミノプロピル)スベルミジン [3(3)(3)4] を有する。分岐鎖ポリアミンが高温での核酸の構造維持に関与し、*T. kodakarensis* の高温 (93°C) での生育に必須である。このため、分岐鎖ポリアミンが遺伝子発現制御に関与していることが考えられる。本研究では、分岐鎖ポリアミンに依存して発現量が変動するタンパク質の網羅的な同定を行った。【方法と結果】 *T. kodakarensis* KU216 株 ($\Delta pyrF$) と DBP1 株 ($\Delta pyrF$, $\Delta bpsA::pdaD$) を栄養培地で培養し、細胞抽出液を 1 次元分離の後、電気泳動のレーンを短冊状に 8 等分に切り出した。切り出したゲル中のタンパク質をトリブシン処理した。LC-MS (nanoLC/LTQ-OrbitrapXL mass spectrometer) を用いたショットガンプロテオミクス法によって同定し、タンパク質のカタログ化を行った。また、タンパク質の発現量を検証するために、Proteome Discoverer 2.0 を用いて半定量解析を行った。ショットガンプロテオミクス法によって、KU216 株で 552 種類、DBP1 株で 613 種類のタンパク質が同定された。そのうち、KU216 株でのみ同定されたタンパク質が 50 個、DBP1 株でのみ同定されたタンパク質が 111 個であった。KU216 株でのみ同定されたタンパク質のうち、抗 TK2069 抗体を用いたウエスタンブロットング解析を行ったところ、ヒドロゲナーゼ構成サブユニット HyhL (TK2069) は DBP1 株では発現していないことが確かめられた。また、qRT-PCR を用いた mRNA の定量解析を行ったところ、*tk2069* 遺伝子の転写産物量は、DBP1 株で顕著に増加していた。このことから *tk2069* 遺伝子の発現は、翻訳レベル (タンパク質レベル) で分岐鎖ポリアミンによる調節を受けていると考えられる。KU216 株でのみ同定されたタンパク質のうち、翻訳量の多かった上位 10 位の遺伝子の転写量が DBP1 株で顕著に増加していた。すなわち、DBP1 株においてこれらの遺伝子の転写量は上昇するが、タンパク質へは翻訳されないことが分かった。同定したタンパク質の生合成における分岐鎖ポリアミンの効果を無細胞翻訳系で検証している。

【目的】 NAD⁺/NADHはあらゆる生物で普遍的に用いられる酸化還元補酵素である。好熱菌もその例外ではないが、NAD⁺/NADHはこれらの微生物の最適生育温度下では容易に分解を受ける熱安定性の低い物質である。我々は、好熱菌が高温環境下で細胞内NAD⁺/NADH濃度の恒常性を維持するための分子メカニズムに興味を持って研究を進めてきた。本研究では高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* を対象に、NAD⁺/NADHをそれらの熱分解産物より再合成するためのサルベージ合成酵素群を同定するとともに、これらが同菌の高温環境下での生育に果たす役割を検証した。【方法・結果】 NAD⁺/NADHの熱分解様式を解析した結果、NAD⁺は高温でニコチンアミドとADP-リボースへと分解されることが明らかとなった。一方、NADHはNAD⁺もしくはその立体異性体である α -NAD⁺を経て、同様にニコチンアミドとADP-リボースへと分解された。*T. thermophilus* のゲノムアノテーション情報および他の微生物で明らかになっているNAD⁺/NADHサルベージ合成酵素との相同性検索により、同菌内でニコチンアミドとADP-リボースからのNAD⁺/NADHの再合成を担う酵素群を同定した。同定された酵素群のうちニコチンアミドのサルベージ利用の初発反応を担うニコチンアミダーゼ遺伝子を欠損させた *T. thermophilus* を作成し、同株の生育試験を行った。*T. thermophilus* の最適生育温度である70℃では、ニコチンアミダーゼ欠損株と野生株の生育速度に大きな違いは見られなかった。一方、最適生育温度を上回る80℃では、野生株に比べニコチンアミダーゼ欠損株の生育遅延が顕著となった。この生育遅延はニコチンアミダーゼの反応産物であるニコチン酸を培地に添加することで軽減された。以上の結果より、*T. thermophilus* においてNAD⁺/NADHサルベージ合成能は、最適生育温度を上回る高温環境下での生育に特に重要な役割を果たすものと結論づけられた。

Dana Ulanova^{1, 2}, Fabricio M. Locatelli³

¹Department of Marine Resource Sciences, Kochi University, ²Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University, ³Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Kochi University

Microorganisms from extreme environments present a potential source for novel bioactive secondary metabolites, even considering the fact their genomes code for less secondary metabolite biosynthetic gene clusters compared to microbes from non-extreme environments. We are interested in the effect of extreme environmental conditions on the evolution of these compounds. In this study, we performed *in silico* analysis of genomes of archaea and bacteria from several extreme environments in order to screen for the presence of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Next, we analyzed the phylogeny of these genes, as well as selected housekeeping genes. Finally, considering that mutation rates may be related to the selective pressure we studied these rates in the context of environmental background.

Arisa Nishihara¹, Shin Haruta¹, Shawn E McGlynn², Vera Thiel¹, Katsumi Matsuura¹

¹Science and Engineering, Tokyo Metropolitan Univ, ²Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology

N₂-fixation in thermophilic chemosynthetic microbial communities is poorly understood. We have studied N₂-fixation in microbial mats at 72-75 °C in Nakabusa hot springs, Nagano. N₂ase activities were highly variable from sampling to sampling. We have focused on the relationship between N₂ase activities and redox conditions in the mats, and tried to identify the metabolisms that are responsible for the N₂-fixation. The N₂ase activities in the mats were correlated with CH₄ production from the mats. The CH₄ production was thought to be a redox indicator, and N₂ase activity was hypothesized to be correlated to the ambient redox potential. To confirm this idea, we evaluated the N₂ase activity under several O₂ conditions. Prior to measurements, mats were maintained under Ar gas or air for 9.5 hour. Acetylene reduction was measured at 70 °C under anaerobic or micro-aerobic (5% O₂) conditions. N₂-fixation activity of the mats maintained under Ar gas was higher under micro-aerobic conditions while mats maintained under air showed higher N₂-fixation activity under anaerobic conditions. These results indicate that a specific range of ambient redox potential is needed for N₂-fixation in these mats. Additionally, N₂ase activity was only observed when sulfate, H₂ and carbonate were present, indicating that chemoautotrophic sulfate reduction is closely correlated to N₂-fixation in the mats.

諸野 祐樹^{1, 2}, Hauer B. Verena³, 稲垣 史生^{1, 2, 4}, 久保 雄介⁵, 前田 玲奈⁵, Expedition 370 Scientists⁶

¹JAMSTEC 高知コア研, ²JAMSTEC 海底資源研究開発セ, ³ブレーメン大学, ⁴JAMSTEC 海洋掘削科学研究開発セ,

⁵JAMSTEC CDEX, ⁶IODP

地球表層の約70%を占める海洋の下には、海水中の生物量に匹敵する量の微生物が生息する「海底下生命圏」の存在が確認されている。その広大な生命圏に存在する微生物生態系の活動は、炭素をはじめとする元素・エネルギー循環や、地球と生命の進化にとって重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、海底下生命圏の空間的な広がりや微生物細胞の代謝機能・進化プロセスは未解明の部分が多く、特に海底下深部環境における生命生息環境の限界及びそれを規定する環境要因は未だ解明されていない。国際深海科学掘削計画 (IODP: International Ocean Discovery Program) 第370次航海「室戸沖限界生命圏掘削調査 (T-リミット)」では地球深部探査船「ちきゅう」を用い、高知県室戸岬沖から南東約120 kmに位置するサイトC0023において、生命が生息可能な温度範囲 (約120°C) をカバーする海底表層から海底下基盤岩層直上までの1180 mの区間でコアサンプルを採取した。特に海底下深部の高温域では生命が存在していたとしても極めて少数であることが予想されたことから、本航海では最高精度の実験を実施するために船上研究チームと陸上研究チームの2チームを編成し、「ちきゅう」船上で一次処理を行った試料をヘリコプターによって高知コアセンターへと搬送した。高知コアセンターにおいては、地上環境による試料汚染を最低限にするため、スーパークリーンルームを構築し、あらゆるコンタミネーションの影響を最小限にした高品位なサンプル部位の採取を実施、さらに厳密な品質管理 (QA/QC)のもと、微生物細胞の検出と定量、DNAの抽出と群集構造解析、Nano-scale Secondary Ion Mass Spectroscopy (NanoSIMS)によって基質取り込み活性を検出することを目的とした現場温度・圧力における安定同位体スパイク培養などを実施した。本発表では船上・陸上における採取試料を用いて即座に実施された室戸沖海底下における極小バイオマスの検出および分布、微生物群集構造解析、海底下試料における無機・有機化学成分プロファイル、海底下現場温度の推定を含めた多方面の科学分析の概要と、高精度の分析を可能とした試料のQA/QCについて紹介する。

神崎 隼人¹, 加藤 真悟², 布浦 拓郎³, 土岐 知弘⁴, 平井 美穂³, 阿部 真理子⁵, 田角 栄二⁵,
澤山 茂樹¹, 中川 聡^{1, 5}, CK16-01 乗船者一同^{1, 2, 3, 4, 5}

¹京都大 院 農, ²海洋研究開発機構 次世代海洋資源調査技術研究開発プロジェクト, ³海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター, ⁴琉球大 院 理, ⁵海洋研究開発機構 深海・地殻内生物圏研究分野

海洋バイオマスの約半分は海底下の微生物細胞である。深海底熱水活動域海底下では、熱水循環によって様々な代謝基質が継続的に供給され、系統的、機能的に多様で活動的な微生物群が存在する可能性が高い。近年、深海底熱水活動域海底下における環境条件と微生物群集構造の関係を理解するため、海底コアサンプルを対象とした研究が進められ、堆積物の物理特性（例えば浸透性）が海底下の水理構造に影響を与え、微生物群集構造を規定する要因となることが明らかになりつつある。数ある熱水活動域の中でも、分厚い堆積物が広がる沖縄トラフ熱水活動域では、広かつ多様な微生物生息域の存在が予測されるが、海底下の地質構造、物質循環と微生物群集の関係に関する知見は限られている。

我々は、2016年2～3月に地球深部探査船「ちきゅう」で、中部沖縄トラフ伊平屋北熱水活動域近傍において採掘調査を実施した。最寄りの熱水噴出孔から約1 km離れ、浸透性が高い軽石堆積層の広がる1地点に着目し、微生物群集構造や生理機能の鉛直分布に関する情報を得るため、微生物細胞の計数、16S rRNA遺伝子を対象とした微生物群構造解析、機能遺伝子 *mcrA* (methyl coenzyme-M reductase) や *amoA* (ammonium monooxygenase A) の多様性解析および各遺伝子の定量を行ったので報告する。

対象とした海底コアサンプルでは、海底面から約70 mbsf (meter below seafloor) まで軽石堆積層が広がっていた。微生物細胞数は、表層付近で 8.8×10^5 cells/g と海洋堆積物表層としては低かったが、10~35 mbsf では細胞数が増加し15 mbsf 付近で最大 1.4×10^7 cells/g に達した。また、16S rRNA遺伝子を対象とした微生物群構造解析や機能遺伝子の多様性解析から、10~55 mbsf において熱水成分に依存した微生物群が存在することが示唆された。具体的には、深さ方向で約30 mにおよぶ比較的広い範囲で嫌氣的メタン酸化を行うとされるANME-1が検出され、それらは過去に沖縄トラフの堆積物から検出された系統群に近縁であった。熱水成分に依存した微生物群は鉛直方向に住み分けが見られ、より浅い部分では海水の影響が強い好氣的環境に対応した微生物群も存在した。これらの結果により、浸透性の高い堆積物が存在する沖縄トラフの熱水活動域周辺では、熱水流体が広範囲に浸透し、部分的に海水と混合することにより、多様な微生物活動を支える複雑な環境が広範囲に形成されていることが示唆された。

中原 望^{1,3}, 吉田 奈央子², 田角 栄二³, 高木 善弘³, 酒井 早苗³, 宮崎 征行³, 山口 隆司¹, 高井 研³, 井町 寛之³

¹長岡技大, ²名工大, ³JAMSTEC

海底下に広がる堆積物環境中には多種多様な微生物が存在し、地球における物質循環に重要な役割を果たしていることが知られている。その一方で、多くの遺伝子解析の結果から、海底下に生息する微生物の多くが未培養かつ機能不明な系統分類群に属していることが明らかにされている。従って、地球における物質循環の理解の促進や新しい生物学的な発見に迫るためには、未知な海底下微生物を培養し、その詳細な特徴を捉えることが基本かつ重要な課題の1つとして認識されている。このような背景から我々の研究グループでは、排水処理技術を参考にしたリアクター培養システムを使って海底下微生物の集積培養を行い、数々の海底下微生物を分離することに成功してきた。本発表では、新たに分離したChloroflexi門Anaerolineae綱の未培養グループに属するMO-CFX2株の生理・遺伝学的特徴について報告する。MO-CFX2株は全長10-200 µm 程度の細長い桿菌で集塊体となって増殖する。通性嫌気性の従属栄養性細菌であり、発酵による主な代謝産物は水素であった。分離にはペプトン等を含む嫌気培地を用いたが、驚くべきことにゲノム解析の結果から、MO-CFX2株は脱ハロゲン呼吸に関連する一連の遺伝子群を持つことが明らかとなった。MO-CFX2株は脱ハロゲン反応の鍵となる還元的デハロゲナーゼ遺伝子を2個保有していた。これまで脱ハロゲン呼吸細菌として同じChloroflexi門に属するDehalococcoidia綱細菌は良く知られていたが、Anaerolineae綱に属する細菌が本遺伝子を有していたことは大変興味深い発見であった。海洋中には天然有機ハロゲン化合物の存在がすること、海底堆積物から多様な還元的デハロゲナーゼ遺伝子が検出されていることから、有機ハロゲン化合物を利用して生育する微生物の存在は以前より示唆されていた。しかしながら、海底下環境において脱ハロゲン呼吸により生育する微生物は未だ発見されていない。現在、MO-CFX2株の脱ハロゲン呼吸による生育を様々なハロゲン化合物を用いた培養実験により調査しているところである。以上、MO-CFX2株が多様な代謝機能(発酵・呼吸)を持つことが明らかとなりつつあり、この多様な代謝機能を持つことでAnaerolineae綱細菌が海底下において優占細菌群となる要因の1つと考えられた。

森澤 高至¹, 若松 泰介², 二神 泰基³, 寺田 武志⁴, 西川 聡美², 大下 紘貴¹, 稲垣 史生⁵, 芦内 誠², 諸野 祐樹⁵
¹高知大・院農, ²高知大・農, ³鹿児島大・農, ⁴マリンワークジャパン, ⁵JAMSTEC・高知コア

海底下には様々な種類の金属イオンが多く存在しているが、海底下環境に生存する微生物と金属イオンとの関わりについての知見は限られている。彼らが持つ金属イオン代謝遺伝子を同定、解析することは、彼らの生存戦略だけでなく海底下環境における金属イオンの濃集や移動についての貴重な知見になると考えられる。そこで本研究では、基質誘導遺伝子発現を指標とした Substrate-Induced Gene EXpression (SIGEX) を用いて、南海トラフ海底下コア試料からの金属イオン応答遺伝子の取得を試みた。まず、挿入DNA断片の下流に *gfp* 遺伝子を繋いだショットガンライブラリー対し Ni^{2+} , Co^{2+} , Mo^{6+} , Ga^{3+} を添加し、それぞれの金属イオンに応答する可能性のある陽性クローン候補数を算出した。次に、 Ni^{2+} と Ga^{3+} を基質として用い、それぞれ196つの陽性クローン候補をセルソーターを用いて単離し、最終的に Ni^{2+} に応答する3つの陽性クローンと Ga^{3+} に応答する4つの陽性クローンを取得した。それぞれのクローンについて Ni^{2+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} に対する応答特異性を解析した結果、ソーティングに用いた金属イオンに対する特異的な応答の他、複数の金属イオンに応答するなど、多様な特異性が見られた。DNA配列解析により、転写因子関連、リボスイッチ関連、プロモーター関連、鉄イオン欠乏応答関連など多くの誘導パターンの可能性があることが明らかとなった。これらの配列の多くはこれまで金属イオン応答が知られていないものであり、本研究はSIGEXが海底下微生物の生存戦略を遺伝子レベルで明らかにする上で強力なポテンシャルを持つことを示している。

戸田 武, 藤 晋一, 古屋 廣光
秋田県大・生資

水稻直播栽培は大規模化、低コスト化、省力化を目的として奨励されているが、この方法は出芽および苗立ちが不安定であることが問題となっている。苗立ちを不良にする要因の一つとして*Pythium*属菌による生育阻害がある。本研究では、2015-2016年に秋田県大潟村の直播栽培に使用した水田において発芽後のイネの芽や根から合計110菌株の*Pythium*属菌を分離した。このうち、2015年に分離された*Pythium*属菌のrDNA-ITS領域の塩基配列を調べたところ、イネの病原菌として報告されていない種が7種含まれていた。この7種の菌株をそれぞれ接種した土壌を作成して、水深を1cmに調整し、昼間25℃夜間15℃の湛水直播栽培の気象条件に近い状態でイネ（品種：あきたこまち）を栽培したところ、何れの菌を接種した土壌でもイネの生育が著しく阻害された（戸田ら、2016）。これらのことから、湛水直播栽培において、*Pythium*属菌がイネのごく初期生育に影響を及ぼすことが考えられた。次に、これらの菌の畑条件での病原性を検討した。7種類の菌株と、イネ苗立枯病の病原菌とされる*P. arrhenomanes*の接種土壌、および無接種の土壌を準備し、播種後25℃で2週間イネを畑状態で栽培して苗の生育を比較した。その結果、無接種区におけるイネの苗立ちは78.9%であったのに対し、*P. arrhenomanes*接種区では23.3%と著しく低かった。7種の*Pythium*属菌の接種区は苗立ち率が37.7-67.7%と無接種区よりも明らかに低かった。全ての接種区のイネから接種に使用した菌株が再分離された。以上のことから、水田にはイネ苗立枯病菌と報告されていないが苗の生育を阻害する*Pythium*属菌が存在し、直播栽培における苗立ちに大きな影響を及ぼしている可能性が高いと考えられた。本稿で紹介した7種以外にも出芽直後の苗から*Pythium*属菌が分離されており、今後、これらの菌の病原性を検討するとともに、他の水田についても調査し、直播栽培のイネの生育に及ぼす影響を明らかにしたい。

磯山 太郎¹, 堀 知行², 門馬 法明³, 宇佐見 俊行¹, 天知 誠吾¹¹千葉大学大学院園芸学研究科, ²産業技術総合研究所, ³園芸植物育種研究所

主に連作が原因で引き起こされる土壌病害は、作物の収量を大幅に減少させることで農業に大きな経済的損害をもたらす。そのため、作物の生産において土壌の消毒は不可欠である。土壌の消毒には、クロルピクリンや1,3-Dなどの土壌くん蒸剤が広く用いられているが、環境や身体へのリスクが大きいことから、これらに代わる土壌消毒の方法が模索されている。土壌還元消毒法は、土壌への有機物の添加と灌水処理、土壌表面の被覆を組み合わせることで土壌の還元化を促進し、その過程で病原菌密度を低減させる方法である。化学合成農薬と比較して、安全な土壌消毒が可能である。しかし、15℃以下の低温環境下では殺菌効果が不安定であることや、その殺菌メカニズムがほとんど明らかになっていないことが、普及上の大きな問題である。そこで本研究では、殺菌メカニズムの解明と低温条件下での殺菌効果再現条件の確立を目的とした。代表的な植物病原菌の一種であるトマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, [以下Folと表記])を用いて30℃と15℃、1%(v/v)エタノール(EtOH)添加有無の組み合わせの4条件で土壌還元消毒の再現実験を行い、各条件におけるFolの生菌数、酸化還元電位、pH、有機酸、Fe²⁺を測定した。さらに、還元処理後サンプルの上清をフィルター滅菌後、Folに添加することで、物理的な微生物の接触無しに殺菌効果を示すのかについての検討も行った。

30℃で1%EtOHを添加した場合には酢酸(8.7 mM)、酪酸(12 mM)などの有機酸やFe²⁺(31 mM)が生成されており、Folは4.0 Log CFU/mLから検出限界(9 CFU/mL)以下にまで減少した。一方、15℃では1%EtOHを添加した場合でもFolは3.0 Log CFU/mLまでしか減少せず、生成されたFe²⁺も8.2 mM程度であった。測定した成分の中で、Fol生菌数と最も負の相関が見られたのはFe²⁺濃度であった。また、還元処理後上清をFolに添加した実験では、30℃、1%EtOH添加条件のサンプル上清が最も高い殺菌効果を示し、Folは5.1 Log CFU/mLから3.7 Log CFU/mLまで減少した。一方、この上清中のFe²⁺が完全酸化された後にFolに添加したところ、Fol生菌数の減少は見られなかった。以上のことから、好気的環境で形態が変化するFe²⁺などの成分がFolの殺菌に大きく関与することが示唆された。現在、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の網羅的解析を行っている。

吉田 重信¹, 平舘 俊太郎², 小坂橋 基雄³, 加茂 綱嗣⁴, 對馬 誠也⁵¹農研機構中央農業研究センター, ²九州大学, ³農研機構畜産研究部門, ⁴農研機構農業環境変動研究センター, ⁵東京農業大学

【背景・目的】 紫外線A波（UVA）は、人の皮膚の光老化の原因とされ、その対抗手段としてUVA吸収剤が開発・利用されている。しかし、既存の吸収剤は種類が限定されており、さらなる吸収剤の開発が求められている。一方、植物体地上部（葉圏）は紫外線ストレスに晒された環境であり、葉圏生息微生物は様々な紫外線対抗手段を有しているとされている¹⁾。そこで、生息微生物の中にはUVAの吸収成分を含有するものが存在する可能性を考え、演者らが保有する葉圏生息微生物コレクションの中からUVA吸収能を持つ微生物を探索するとともに、見出した微生物に由来する吸収成分の特性を調べた。【方法】 イネやコムギ等の植物体から分離された細菌計200菌株を供試し、常法に従い寒天平板培養物から菌体を回収後、菌体乾燥物を調製した。各乾燥物から含水メタノールで抽出された菌体粗抽出液を分光光度計で測定し、320-400nmの波長域での吸収ピークの有無を調べた。また、抽出液に含まれる吸収成分の抽出特性を調べるとともに、主たる吸収成分を単離・精製し、その光安定性を、HPLCによるピーク形状の変化により評価した。【結果と考察】 分光光度計による測定の結果、200菌株中17菌株の抽出液で、360nmの波長付近に最大吸収ピークを示す吸収スペクトルを示すことが明らかになった。16S rRNA遺伝子の塩基配列解析の結果、これらの菌株はいずれも*Methylobacterium*属に属し、系統解析の結果、これらは様々な種で構成されていることが示唆された。また、本吸収成分は熱安定で、乾燥菌体からは含水メタノールや水などで抽出される一方、低極性溶媒では抽出されなかったことから、極性の高い低分子成分であると示唆された。粗抽出液から固相抽出カラムおよびHPLCにより精製された吸収成分のUVA吸収能および吸収スペクトルは、既存の吸収剤のアポベンゾンとほぼ同等であった。また、精製成分の光安定性を評価した結果、HPLCピークの形状は、日光下およびUVAランプ照明下に暴露した後でも変化が認められなかった。以上の結果から、本吸収成分は、既存の吸収剤にはない極性が高い特徴を有するユニークな天然由来UVA吸収成分として、日焼け止めの原料等の用途に活用できる可能性が考えられた。【参考文献】 1) Sundin, G.W. (2002) Phyllosphere microbiology pp.27-41. APS press.

南澤 究¹, 篠田 亮¹, 包 智華^{1, 2}¹東北大・院生命, ²内モンゴル大・環境

【背景と目的】 演者らは、低窒素環境で水稻根のメタン酸化と窒素固定が同時に活性化され、それが植物共生系(OsCCaMK)によって制御されている可能性を報告した。種々の状況証拠から、水稻根のtype IIメタン酸化細菌が窒素固定を担っている可能性がある。そこで、水稻根よりMethylosinus属細菌を分離し、メタン酸化依存的な窒素固定を行う能力がある明らかにすることを目的とした。【実験方法】 低窒素および慣行区の鹿島台圃場で栽培したイネ（日本晴）の根をサンプリング後水道水で洗浄し、1Lバッグに入れ、気相を30%15N₂ (33.2 atom%) と20% O₂を含むArガスに置換し、5%CH₄添加区と非添加区を設け、25度で26時間インキュベーションを行った。1% NaOClで表面殺菌した低窒素区イネ根をNMS寒天培地に置き、40% CH₄を含む空気で培養を行った。その後、NMS寒天培地および液体培地限界希釈による純粋分離を行った。Methylosinus属細菌は絶対メタン酸化細菌であり従属栄養生育も調べた。純粋分離された3S-1株は、NMS培地および窒素源を除いたN-Free NMS培地を用いて、15N₂, CH₄, O₂を含む種々の気相組成下で培養を行い、細胞内へ15Nの取り込みを安定同位体質量分析計で、増殖を濁度で、気相組成変化をガスクロで測定した。【結果と考察】 CH₄を投与した低窒素区のイネ根のみで15N濃度の有意な上昇が観察されたので、当該イネ根のCH₄依存的な窒素固定を行っていることが明らかになった。低窒素区のイネ根よりMethylosinus sp. 3S-1株の分離に成功し、ドラフトゲノムを決定したところ、窒素固定遺伝子(nifHDKENSU)とメタン酸化遺伝子群(pmoCAB, mmoRGXYBZDC)を保有していた。メタン酸化阻害剤CF₂H₂を投与するとメタン酸化は停止し、細胞内の15N濃度上昇（窒素固定活性）も徐々に低下した。また、10% O₂という高い酸素分圧でも3S-1株のメタン酸化依存的な窒素固定が生じていた。以上の結果より、Methylosinus属細菌が低窒素圃場イネ根のメタン酸化依存的な窒素固定を行っていることが示唆された。そのイネ組織内の生息部位やその意義について議論したい。

篠原 一輝¹, 園田 咲¹, 浅井 辰夫³, 高橋 冬実², 小杉 徹², 鮫島 玲子³¹静岡大学・院農, ²静岡県・農林技術研究所, ³静岡大・大学院農

糸状菌脱窒は一酸化二窒素(N_2O)生成源の一つとして注目されており、茶園土壌では糸状菌脱窒が主要な N_2O 生成源であると考えられている。また、茶の畝間に刈り取って乾燥させたススキやササを敷く茶草場農法が世界農業遺産に登録され、注目を集めている。本研究では静岡県の窒素施肥標準に基づき、STN（窒素標準区）、STNC（窒素標準+茶草区）、3N（窒素3倍区）、3NC（窒素3倍+茶草区）の4つの茶園試験区を設け、過剰施肥や茶草施用に対する脱窒糸状菌の動態を調査した。

ローズベンガル培地を用いた希釈平板法により、各試験区から糸状菌を計37株単離して脱窒活性を測定した。その結果、脱窒活性を持っていたのがSTNでは3株、STNCでは1株であった一方、3Nと3NCの単離株はすべて脱窒活性を持ち、ほとんどがSTNやSTNCの脱窒糸状菌の2~3倍の脱窒活性を有していた。3Nと3NCの単離株について、18S rDNA、ITS領域、 β -チューブリンを用いた系統解析を行ったところ、17株中14株が *Penicillium* 属か *Phialosimplex* 属であった。これらの属は一般に畑土壌で優占するとされる脱窒糸状菌である *Fusarium* 属や *Trichoderma* 属とは異なっており、過剰施肥によって脱窒糸状菌が集積し、特有な脱窒糸状菌叢が形成されていることが示唆された。一方、茶草の有無による単離された脱窒糸状菌の種類や脱窒活性の違いは見られなかった。相同性検索の結果、*Penicillium* 属や *Phialosimplex* 属の株の中には既存の種と異なる系統に属する株が存在することも明らかになった。これらの株は全単離株の中でも高い脱窒活性を有しており、過剰な窒素施肥に特異的に適応している種である可能性が考えられた。続いて、*Penicillium* 属や *Phialosimplex* 属の土壌中での動態を調査するためDGGE解析を行った。その結果、*Phialosimplex* 属は3Nと3NCで特異的に出現し、優占することが明らかになった。*Phialosimplex* 属は単離したすべての株が高い脱窒活性を有していたことから、過剰施肥茶園土壌における N_2O 発生に大きく寄与していることが考えられた。DGGEバンドパターンは窒素施肥量によって大きく変化した一方、茶草の有無による変化は小さかった。同じ圃場における N_2O フラックスの測定では、3Nと比較して3NCで N_2O フラックスが減少しており、茶草施用による糸状菌叢の変化が影響しているかどうか、今後調査していく必要が考えられる。

遠藤 力也, 大熊 盛也
理研・BRC

1990年代以降、本州の日本海側を中心にブナ科樹木萎凋病、通称ナラ枯れによる樹木の大量枯損が問題となっている。ナラ枯れは、体長5 mmほどの甲虫カシノナガキクイムシ *Platypus quercivorus* (Platypodidae, Coleoptera; 以下、カシナガ) が植物病原糸状菌 *Raffaelea quercivora* を伴って樹幹部に集中穿孔することによって引き起こされる。カシナガは主に樹木の辺材部に坑道Beetle galleryを造営し、その壁に生育する共生菌を食餌源にするといわれる養菌性キクイムシAmbrosia beetlesの一種である。発表者らはこれまでの研究で、坑道壁から高頻度に分離される菌類は穿孔した樹種に依らず子囊菌酵母 *Ambrosiozyma* spp., サッカロミセス亜門の未同定種(*Saccharomycotina* sp.)と *R. quercivora*に限られることを明らかにした。特に酵母類が坑道壁で優占しており、これらがカシナガの主要共生菌と考えられたが、実際に食餌源になっているかは不明だった。

そこで発表者らはカシナガの主要な食餌源を確定するため、集中穿孔のために宿主木（コナラ）へ飛来したカシナガ成虫を捕獲し、消化管内の菌類叢を培養法によって解析した。その結果、メス成虫（11頭）の前胃からは *Ambrosiozyma* spp., *Saccharomycotina* sp.および *R. quercivora*がおおむね高頻度（45.5-100%）に分離された。また、前胃より先から肛門までの消化管からはこれらの菌類はほとんど分離されなかった。これは、前胃付近では未消化の菌が存在するものの、前胃より先では未消化で生残している菌がほとんどいないためと考えられる。一方、オス成虫（14頭）では前胃を含む消化管全体を通じて、いずれの菌種に分離頻度も0-14.3%と極めて低かった。メス成虫における結果とは全く異なり、この性差の理由は不明である。

メス成虫における菌類の分離結果から、*Ambrosiozyma* spp., *Saccharomycotina* sp.および *R. quercivora*がカシナガの食餌源として寄与している可能性が示された。分子系統が全く異なる酵母群がカシナガの主要共生菌である理由は不明であり、共生系における菌種ごとの生態学的役割の解明も今後の課題である。

小泉 敬彦, 奈良 一秀
東京大・新領域

外生菌根菌（以下、菌根菌）の群集構造は、生息地の気候や地理的位置のほか、宿主となる樹種に大きく影響される。一般に、気候条件や空間距離によって樹種組成も変化するため、宿主を除いたこれら非生物的要因の相対的影響を把握するのは困難である。本研究では、日本の高山帯に隔離分布して純林を形成するハイマツに着目し、その菌根菌群集に及ぼす気候・土壌環境と空間距離の影響を解明することを試みた。国内9カ所のハイマツ林に調査区（2–3反復）を設置し、成熟林内30地点の土壌コア（リター層・鉱質土層）および実生30個体を各調査区から採取した。土壌中および実生の菌根を形態により類別し、rDNA ITS領域の塩基配列によって菌種同定を行った。合計5277の菌根サンプルから、177種の菌根菌が検出された。調査区単位での推定種数を目的変数とし、地理（緯度・経度）と気候（標高・気温・降水量）、土壌環境（pH、電気伝導度、土壌C・N量）を説明変数とした重回帰分析の結果、リター層菌根では土壌pHと標高（ $R^2=0.59$, $P<0.01$ ）、鉱質土層菌根では土壌N量（ $R^2=0.30$, $P=0.03$ ）を用いたモデルが最も支持された。単独でも有意性が認められた土壌pHと土壌N量はともに推定種数と正の相関が認められたことから、高山環境で発達する有機物層では強酸性化によって、その下の鉱質土層では養分欠乏によって菌根菌の種数が制限されていることが示唆された。各調査地区成熟林内で見られた菌根菌群集の空間構造をマンテル検定によって解析した結果、樹種の影響を含んだ既存研究よりも広域な約200 kmまでの距離クラスにおいて、菌種組成に有意な空間自己相関が認められた。こうした空間的要因に加え、気候と土壌環境の相対的な影響をdb-RDAにより評価した結果、成熟林・実生菌根ともに気候に関する要因の影響が最大であった。高山帯は気候変動の影響が特に懸念されているが、樹種が変化するよりも前に菌根菌群集に影響が及ぶ可能性が示唆された。

後藤 康彦¹, 松垣 正吾², 保坂 健太郎³, 柴田 尚⁴, 広井 勝⁵, 野村 貴美⁶¹菌類懇話会, ²東京大学アイソトープ総合センター, ³国立科学博物館, ⁴山梨県森林総合研究所, ⁵郡山女子大学, ⁶明治大学

福島第一原発事故から6年、富士山、千葉県および茨城県の各種林において野生きのこを採集し、ゲルマニウム半導体検出器を用いてきのこの放射性セシウム濃度を測定してきた。富士山北面の山梨県で採集した腐生菌のチャナメツムタケの乾燥試料の $^{134}\text{Cs}+^{137}\text{Cs}$ （以下Cs）濃度は2011年をピークに年々減少してきた。カラマツの菌根菌ハナイグチの乾燥試料のCs濃度は緩い減少傾向にあり、針葉樹の菌根菌のアカモミタケのCs濃度は緩く減少傾向である。須走口のカラマツの菌根菌のキノメリガサでは横ばい傾向であった。富士山における全体的な傾向としては腐生菌では減少し、菌根菌では緩く減少ないし横ばい傾向であった。千葉県我孫子市のシラカン・スギ林で2012年から2016年に採集した菌根菌のムラサキヤマドリタケおよびオキナクサハツのCs濃度の経年変化は増加ないし横ばい傾向であった。同所で採集した腐生菌アミガサタケのCs濃度は減少していた。茨城県石岡市のコナラを主とする林で2013年から2016年に採集したタマゴタケのCs濃度は増加していた。茨城県友部市のコナラを主とする林で2013年から2016年に採集したアカヤマドリのCs濃度も増加していた。千葉県北部および茨城県中南部の常緑広葉樹および落葉広葉樹林の菌根菌きのこのCs濃度は増加ないし横ばい傾向であった。それに対して腐生菌のアミガサタケのCs濃度は減少していた。これらは現時点での暫定的な傾向であり、今後さらに調査を継続してより正確なデータを報告したい。Cs濃度 1000Bq/kg (生重)を超えた野生きのこは富士山では643試料中17試料、千葉県北部263試料中13試料、茨城県中南部110試料中15試料になる。Cs濃度 100Bq/kg (生重)を超えた野生きのこは富士山では643試料中348試料、千葉県北部263試料中100試料、茨城県中南部110試料中60試料であった。その他に各地の野生きのこの放射性セシウム濃度の福島原発事故の寄与率を報告する。

広井 勝¹, 影山 志保¹, 桧垣 正吾², 保坂 健太郎³, 後藤 康彦⁴¹郡山女子大, ²東大RIC, ³国立科博, ⁴菌類談話会

2011年の福島第一原子力発電所の事故により、福島県内には多量の放射性セシウムが飛散した。事故以後、県内の野生きのこの放射性セシウム濃度について継続的に分析を行ってきた。今回は、2016年度の放射性セシウム濃度の現状と動向について検討した。放射性セシウム濃度は、ゲルマニウム半導体測定器ならびにPerkin Elmer社のNaIシンチレーション式 γ 線スペクトロメータで測定した。昨年同様、比較的空間放射線量率の高い地域である相馬、飯館地区と、中間的地域である郡山市周辺、空間放射線量率が比較的低い地域である会津北塩原村、柳津町周辺のきのこを対象に分析した。その結果相馬、飯館周辺の地表面の空間放射線量率はいまだ $0.8\mu\text{Sv}$ /前後のところが多く、飯館地区では $3\mu\text{Sv/h}$ 以上の所も見られた。この地域で分析したきのこでは、半数の種でいまだCs134+Cs137の合計が生重量で500Bq/kgを超えていた。特にムラサキアブラシメジモドキ、コウタケ類似種、キハツタケ、ハツタケ、マツタケ、フジウスタケ、クサウラベニタケなどでは10,000Bq/kgを超えるものが見られた。郡山市周辺では地表面の空間放射線量率は $0.4\mu\text{Sv/h}$ 前後の所が多かった。この地域のきのこでは、チリメンチタケ、キチチタケ、ハツタケ、ウスムラサキシメジ、クサウラベニタケなどで4,000Bq/kgを超えるものが見られた。会津地域のように空間放射線量率が0.1から $0.2\mu\text{Sv/h}$ と比較的低い地域のきのこでもホテイシメジ、キチチタケ、ベニナギナタケ、ハツタケ、キシメジなどは1,000Bq/kg以上を示すものが見られた。同一地域で採取したものでも、きのこの種類、採取場所によりセシウム濃度かなりの異なりが見られた。昨年の結果と比較して見ると、濃度が上昇しているものと、反対に低下しているものがあり、この原因は除染や台風、大雨による森林の生態系の変化と合わせ、放射性セシウムの移動が影響しているように思われた。いくつかのきのこを例にとり、空間放射線量率と子実体の放射性セシウム濃度の関係や同一きのこの年次変化、分類学的に近縁な種の放射性セシウム濃度の比較についても報告する。

東樹 宏和^{1, 2}¹京大・生態研, ²JSTさきがけ

陸上植物は4億5000年前に陸上進出した最初期の頃から、菌根菌をはじめとする微生物たちに依存した戦略の下、「共生体」として進化してきた。現在においても、農地生態系であれ、自然生態系であれ、植物は多様な細菌・真菌類と関わり合って生存している。しかし、こうした微生物たちと植物で構成されるシステム全体の挙動について、人類はまだその一部しか知り得ていない。土壌中のリンや窒素の効率的供給や、病原性真菌・卵菌・節足動物・線虫からの保護など、微生物が植物にもたらす機能は計り知れない。次世代シーケンサーの登場以降、こうした微生物たちへの関心が一層高まっているが、微生物たちの極めて高い多様性に阻まれて、共生系の包括的理解からは未だほど遠い状態である。植物とその共生微生物で構成される系を読み解く際、宿主と共生者間の相互作用だけではなく、無数の共生微生物同士の相互作用ネットワークについて理解することが求められる。個々の微生物と宿主の関係を積み上げただけでは共生系全体の動態は予測できないため、従来とは異なる研究の戦略が必要とされるに至っている。本発表では、植物-共生微生物ネットワーク(Nature Communications 5:5273; Science Advances 1:e1500291)や共生微生物間ネットワーク(J. Royal Soc. Interface 13:20151097)に関して、膨大な生物群集データをいかに解析していけるのか解説する。また、微生物群集の中で「コア」として働いている微生物をスクリーニングする手法(Nature Ecology & Evolution 1:0024)について、次世代シーケンスデータをもとにしたネットワーク解析法を概説する。省資源型農業への移行や深刻化する病害パンデミックのリスクを考慮すれば、「微生物群集の機能を最大限に活かす農業生態系」の構築こそ、諸課題への根本的解決策となり得る。今後進展するであろう微生物学・植物科学・生態学の融合について、議論を深めたい。

晝間 敬^{1,2}, 北川 のぞみ¹, 田中 碧¹, 西條 雄介¹¹奈良先端大, ²さががけ

根圏の共棲微生物は貧栄養環境下での植物の生長・生存を助ける役割を担っていると考えられている。これまでに、野外で生育するアブラナ科のシロイヌナズナから単離した *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) が、リンの欠乏した環境下でシロイヌナズナや近縁のアブラナ科植物の根に感染しリンを植物へと輸送することで植物生長を促すことを報告している (Hiruma et al., Cell 2016)。また、これまでの研究により、Ct による植物生長促進効果には宿主のリン酸トランスポーターなどの遺伝子の発現を制御する転写因子である PHR1 とそのパラログである PHL1, さらにリン酸トランスポーターの細胞膜への輸送を担う PHF1 が必要であることを示している。本発表においては、リン吸収の場と考えられる根毛形成に関わる因子やリンの根の木部から地上部への輸送に関与する因子がリン欠乏時における Ct による植物生長促進に必要なものであるか調査した。根毛形成に必要な RHD6 遺伝子を欠損した変異体においては、Ct が存在しない場合の植物生長は野生型植物と比較して低下したものの、Ct による植物生長促進効果に関しては野生型植物と同等レベル以上認められた。このことから、根毛は Ct との共棲関係樹立及びそれに続く Ct による植物生長促進には必須ではないことが示唆された。一方で、木部からリンを地上部へと運ぶ遺伝子である PHO1 が欠損した変異体では Ct による植物生長促進効果が認められなかった。以上の結果から、Ct による植物生長促進効果の発揮には、リン酸トランスポーターによるリン吸収とそれに続く地上部へのリン輸送が重要であることが示唆された。

久我 ゆかり¹, Ting-Di Wu^{2, 3}, Jean-Luc Guerquin-Kern^{2, 3}, 永田 康祐⁴, 坂本 直哉⁵, 坂本 尚義⁴, 勝山 千恵¹

¹広島大・院総科, ²Institut Curie, France, ³INSERM, France, ⁴北大・院理, ⁵北大・創成機構

Glomeromycotaに属する種はすべて生活環に光合成生物を必要とし、*Geosiphon pyriforme*を除き、アーバスキュラー菌根（AM）を形成する。AM菌は宿主植物と絶対共生の関係にあるが、同時に絶対共生細菌の存在が知られている。内生細菌は、AM菌種に広く存在し、細胞質に局在するMollicutesに近縁のグラム陽性細菌（GPB）、およびGigasporaceaeにのみ観察され、液胞中に局在する*Burkholderia*属に近縁のグラム陰性細菌（GNB）の2種が報告されているが、いずれも宿主との相互作用など機能のほとんどは未知である。本研究は内生細菌への炭素の輸送を明らかにすることを目的とし、安定同位体でラベルした菌根植物を用い、二次イオン質量分析（SIMS）イメージング法による局所解析を微細構造レベルで行った。GPBおよびGNBの両者を有する*Gigaspora margarita*を*Allium cepa*に接種し、菌根植物を $^{13}\text{CO}_2$ に曝露した後化学固定し、定法に従って樹脂包埋した。菌根の樹脂切片における同位体画像をIMS1270（SCAPS付属）で広範囲で取得し、さらに、微細構造観察およびnanoSIMS50による同位体画像取得を同じ超薄切片試料を用いて行った。これら同位体画像から同位体比画像

（ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $r13\text{C}$ ）を作成し、GPBおよびGNB各3細胞を含む菌糸断面計5つをROI解析した。その結果、GPB およびGNBの $r13\text{C}$ はそれぞれ2.6～3.2、および2.0～2.2で、同位体比が最も低い構造である液胞（植物、1.2；AM菌、1.6）より有意に高く、炭素の輸送が示された。細胞質に局在するGPBの $r13\text{C}$ は液胞中のGNBより有意に高かったが（ $P<0.05$ ）、いずれも隣接するAM菌細胞質の同位体比（3.5～5）を下回った。一方植物細胞質（約2～3.5）に対するAM菌細胞質、植物のミトコンドリア、およびプロプラスチドの $r13\text{C}$ の割合は、それぞれ1.1～1.6、約1、および約1.5であった。以上のことから、 $r13\text{C}$ は宿主AM菌の細胞質より内生細菌で低く、宿主植物とAM菌の関係と異なること、また局在および分類群を異にする2つの細菌で炭素分配が異なる可能性が示された。

本庄 三恵¹, 永野 惇², 川越 哲博¹, 杉阪 次郎¹, 榮村 奈緒子¹, 神谷 麻梨^{1, 2}, 工藤 洋¹¹京大・生態研セ, ²龍谷大・農

ウイルスの感染はしばしば病気や大量死を引き起こす一方、自然生態系においては顕著な病徴を引き起こさず宿主に感染するものも多く存在すると考えられる。また、宿主植物にストレス耐性を付与するウイルスの存在や、海洋生態系ではウイルスが物質循環や多様性維持に寄与していることが報告されている。環境が変動する自然生態系では、宿主への影響やウイルスと宿主の相互作用が季節により変化している可能性がある。本研究では、宿主内でのウイルス量とそれに対する宿主の遺伝子発現応答が自然環境下で季節的に変化するかどうかを明らかにすることを目的とした。研究対象とする宿主とウイルスには、モデル植物シロイヌナズナに近縁な多年生草本ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* subsp. *gemmifera*) の野生集団とカブモザイクウイルスを用いた。ウイルス量の季節変化を明らかにするため1週間に1回、6個体について葉のサンプリングを3年間行い、一部についてRNA-seqと定量PCRを行った。その結果、感染植物（2個体）はクローン繁殖を通じて回復することなくウイルスを保持し続けていること、上位の新しい葉のウイルス量は冬に低下し春に増加するという季節性をもつことが明らかとなった。一方、比較的古い下位葉ではウイルス量に顕著な季節変化が見られなかった。室内実験により、新しく展開した上位葉でのウイルスの広がりには低温により抑制されていることが示唆された。次に、ウイルスの感染の有無による宿主の遺伝子発現の違いを明らかにするため、異なる季節にそれぞれ48個体から葉をサンプリングし、RNA-seqにより野生植物集団での網羅的遺伝子発現解析を行った。感染個体と非感染個体の遺伝子発現量を比較した結果、春に感染個体で病害応答遺伝子の発現が高まり、秋には光合成やショ糖応答、アントシアニン合成に関わる遺伝子の発現が低下するという結果が得られた。これらのことから、感染個体内ではウイルス量が季節変化し、非感染個体とは異なる遺伝子発現を示すことが明らかとなり、ハクサンハタザオの野生集団では遺伝子発現を介して宿主とウイルスの相互作用が季節的に変化していることが示唆された。

竹内 美緒¹, 尾崎 遼², 平岡 聡史³, 大島 健志朗⁴, 服部 正平⁴, 鎌形 洋一⁵, 岩崎 渉³

¹産総研・バイオメディカル, ²理研・情報基盤センター, ³東大・理・生物情報, ⁴東大・メタゲノム情報科学, ⁵産総研・生物プロセス

メタン酸化細菌（メタノトロフ）とメタノール資化性菌（メチロトロフ）の密接な関係は70年代から報告されている。多くの自然環境や人工環境での共存が知られている他、共生するメチロトロフの存在が、メタノトロフの分離培養を困難にしているケースも多く報告されている。その共生機構はメタノトロフが分泌するメタノールをメチロトロフが利用するクロスフィーディングと言われてきたが、その詳細については多くが未知である。我々は海底堆積物から培養によって得たメタノトロフとメチロトロフを含む混合株から新規メタノトロフである γ プロテオバクテリアの*Methylocaldum marinum* S8ならびに通性メチロトロフである α プロテオバクテリアの*Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4を分離した。そして、これら2株のゲノム情報を解読すると共に、メチロトロフについて単独でメタノールで増殖する際と、メタノトロフとのメタンのみを炭素源とした共培養時の発現遺伝子解析を行った。各培養株からRNAを抽出し、HiSeq 2500でシーケンスを行った。得られたRNAseqデータは、STAR (V 2.5.2b)、samtools (1.3)、EdgeR (3.16.5)、R (3.3.1)により解析を行った。*M. marinum* のゲノムは6.1 Mbp であり、soluble methane monooxygenase 遺伝子の他、particulate methane monooxygenase遺伝子を含み、ホルムアルデヒド固定経路としてRuMP経路遺伝子が確認された。*M. caenitepidi* のゲノムは3.4 Mbpであり、メタノール代謝に関わる遺伝子群 (mxhFJGIRSACKLD)の存在や、セリン経路遺伝子群が確認された。また、メチロトロフについて共培養時と単独培養時の発現遺伝子の比較を行った結果、単独培養時と共培養時で283の遺伝子に変動が見られ(FDR<0.05)、84遺伝子が共培養時に発現が増加し、196遺伝子が共培養時に発現が減少していた。本講演では、これらの発現遺伝子の詳細解析結果を報告する。

奈須野 恵理¹, 佐々木 裕哉², 鈴木 良子¹, 飯村 兼一¹, 加藤 紀弘¹
¹宇大・院工, ²宇大・工

グラム陰性細菌の細胞間情報伝達機構Quorum Sensing (QS)は、シグナル物質である*N*-アシルホモセリンラクトン (AHL)により様々な標的遺伝子の発現を制御している。膜分離活性汚泥法において汚泥と処理水の分離効率低下を招くバイオフィウリングは、分離膜表面に形成されるバイオフィルムの影響を受けており、複数の細菌でバイオフィルム形成にAHL濃度依存性のQS機構が関与することが明らかにされている。QS機構制御に基づくバイオフィルムの形成阻害技術は、バイオフィウリングの抑制への応用が期待されている。これまでに、AHLラクトナーゼとAHLアシラーゼ生産菌の多くの報告例がある。本研究は、活性汚泥由来のAHL分解細菌からクローニングしたアシラーゼのAHL分解特性を評価した。外部添加した短鎖AHLにのみ応答して紫色色素Violaceinを生産する*Chromobacterium violaceum* CV026を利用し、栃木県の浄化センターの活性汚泥から*N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL)分解細菌をスクリーニングした。C6-HSL分解能を示した*Roseomonas* sp. TAS13株のドラフトゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し、AHL分解活性が報告されている既知のアシラーゼとアミノ酸配列相同性が高いCDSを複数特定した。一部のCDSはクローニングし、MBPタグ融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、それぞれのAHL分解特性を解析した。AHLアシラーゼ活性を有する*Roseomonas* sp. TAS13株のゲノムには既知のAHLアシラーゼと相同性が高いCDSが11個含まれており、このうちクローニングした3つは*Roseomonas*属細菌のPenicillin acylase、Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A (GatA)、Acylamidaseに対してそれぞれ99%、99%、84%のアミノ酸配列相同性を示した。これらの酵素はどれもC6-HSLを加水分解するが、アシル鎖長がC10以上のAHLに対して異なる基質特異性を示した。アミノ酸配列の相同性に基づく機能予測によりAmidaseに分類されるGatAは細菌ゲノムで保存性が高く、細胞内では3つのサブユニットで構成されるGatCAB複合体を形成している。リン酸化したグルタミン酸-tRNA^{Gln}は、GatAにより加水分解されたグルタミンから遊離するアンモニアを用いてグルタミン-tRNAへと変換される。GatAのAHL分解活性を示したのは本研究が最初である。本発表ではこれらの酵素の分子認識能や基質選択性について報告する。

千浦 博, 熊谷 洋平, 吉澤 晋, 木暮 一啓
東京大学 大気海洋研究所

我々は、系統的に広範囲（Archaea-Bacteria-Eukarya）の受容生物に宿主染色体断片（50–400 kb dsDNA）、プラスミドおよび細胞質物質を伝達し、生じた形質導入体が再度同様の生物学的特徴を有する娘粒子を出芽生産する連続一般型形質導入現象で特徴付けられる「広宿主域遺伝子伝達粒子」（VP）の自然ウイルス様粒子群集での存在を実証した [Chiura 2004 Microbes Environ]. 膜小胞の構造的特徴を有するVPは感染に際し膜融合により受容体に内容物を転移する新規の水平遺伝子伝達手段である [Chiura *et al* 2009 Microbes Environ, 2011 FEMS Microb Ecol].

至適生育温度10°Cの*Polaribacter filamentus* ATCC700397^Tが生産したVPを、*Escherichia coli* AB1157に感染させ生じた形質導入株（PfEtrans）はVP産生を獲得し、至適生育温度：30°C、0°Cでも増殖した。また、10°C、1/2 ZoBellでの培養は最大増殖密度~2E+9 cells/mLを示した。宿主の生育温度への適応、VP出芽生産と一般型形質導入の関連遺伝子転移を明らかにすべく行った、PfEtrans, *P. filamentus* ATCC700397^T, *E. coli* AB1157, *Acholeplasma laidlawii*とpleomorphic virusの比較ゲノム解析は、PfEtransが受容*E. coli* AB1157と98.7%、VP給源*P. filamentus*と35.6%のアミノ酸配列相同性を示し、10°Cでの耐塩・耐冷性と高成長率の獲得は、ストレス応答代謝関連遺伝子の増強に起因し、出芽に必須な膜タンパク質はウイルス性ではなく細胞起源であることを示唆した。VPの生産制御や構成関連遺伝子群の解明を継続中であるが、VPは生物の環境適応および多様性獲得に寄与し細胞性生物に広く分布する事が予測される。

岸田 康平, Tim Lucas, 大坪 嘉行, 永田 裕二, 津田 雅孝
東北大学・院生命

【背景・目的】プラスミドの接合伝達による遺伝子の水平伝播は生物の多様な環境への適応進化に大きく寄与している。接合伝達装置は共通した2つのシステムにより成り立つと理解されており、Dtrシステムはrelaxaseを中心とした供与菌内で接合伝達開始領域から一本鎖DNA (ssDNA)を生成し、Mpfシステムは供与菌と受容菌細胞同士を連結する接合対を合成する。各種の接合伝達性プラスミドでこれらシステムに関連する遺伝子が保存されている。一方、我々はIncP-9群に属するナフタレン分解プラスミドNAH7の研究で、既存の接合伝達モデルに含まれていない接合伝達必須遺伝子 *orf34* を同定した。*orf34* はいくつかのMPF_T群のプラスミド上に保存されていたが、機能は不明であった。そこで本研究では新規接合伝達必須遺伝子 *orf34* の機能解明を目的とした研究を行った。【結果・考察】Orf34が供与菌、受容菌のどちらで機能するかを明らかにするため、供与菌と受容菌のいずれかにpUC18::*orf34*を保持させ、*orf34*を破壊したNAH7誘導体(以下、NAH7Δ34)の接合伝達試験を行ったところ、供与菌にpUC18::*orf34*を保持させた株のみがNAH7Δ34の接合伝達能が回復した。次に、Orf34の供与菌細胞内での局在を解析するため、FLAGタグを付与した*orf34*を発現するプラスミドを作製した。このOrf34-FLAGはOrf34と同等の機能を有していることを接合伝達試験で示した。次に、Orf34-FLAGを発現させた細胞を細胞膜、ペリプラズム、細胞質に分画後、FLAG抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、ペリプラズム画分でシグナルが検出された。このことからOrf34はペリプラズムで機能していることが強く示唆された。ペリプラズムへの局在性からOrf34はMpfシステムと共に機能すると推定されたため、Mpfシステムの各種タンパク質との相互作用をBacterial Two Hybrid法で検討したが、現段階でOrf34と相互作用を有すタンパク質を見出されていない。相同性検索よりOrf34はTrbMドメインの一部を有していると推測された。このドメインを有すタンパク質をコードする遺伝子はIncW群のR388、IncP-1群のR751の上にも存在し、それぞれ*kikA*と*trbM*であった。これらの遺伝子産物はOrf34との相同性は非常に低かったが、NAH7Δ34に*kikA*や*trbM*を相補したところ、NAH7Δ34の接合伝達能は回復した。このことから*orf34*と同機能を有す遺伝子が多く、プラスミドで保存されていると示唆された。

菅原 雅之¹, 高橋 智子¹, 梅原 洋佐², 岩野 裕也¹, 今道 仁¹, 今野 勇希¹, 大竹 遥¹, 佐藤 修正¹, 三井 久幸¹, 南澤 究¹
¹東北大・院生命, ²農研機構

マメ科植物と根粒菌の共生関係には厳密に決定された宿主特異性がある。最近の研究により、宿主植物は抵抗性Rタンパク質を利用して根粒菌から打ち込まれる3型分泌タンパク質（エフェクター）を感知し、病原防御応答に類似した免疫反応を介して共生者を選抜していることが明らかとなってきた。一方で、これに関係する遺伝子が根粒菌と植物の双方から同定されてきているが、それらの詳細な機能やタンパク質同士の相互作用についてほとんど明らかとされていない。本研究では、根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122株と *Rj2*遺伝型ダイズとの間に観察される根粒形成不全（共生不和合性）に着目し、その原因となる根粒菌エフェクターの機能解明を目的とした。

まず原因エフェクターを同定するため、*Rj2*ダイズに根粒を形成するUSDA122の突然変異株を複数単離した。それらのドラフトゲノムおよび遺伝学的解析の結果から、機能未知の3型分泌エフェクターNopPが共生不和合性を誘導する因子であることを見出した。NopPをコードする遺伝子（*nopP*）は、*Rj2*ダイズに根粒を形成する和合性の菌株を含め、ほぼ全ての *Bradyrhizobium*属ダイズ根粒菌のゲノム上に見出される遺伝子であった。一方USDA122のNopPアミノ酸配列から、和合性の菌株 *B. diazoefficiens* USDA110と比較して4つの特異的なアミノ酸残基 (R60/R67/H173/F271) が認められた。そこで両菌株間で *nopP* 遺伝子の交換を行ったところ、USDA122株タイプの配列を有する株にのみ *Rj2*ダイズに対して根粒形成不全が観察された。また上記4残基のアミノ酸置換の結果、*Rj2*ダイズへの共生能はNopPのアミノ酸1残基の違いのみでは決定されず、複数のアミノ酸が関与した特定の配列パターンで決定していることがわかった。以上の結果、ダイズはRタンパク質を介して根粒菌3型エフェクターNopPをモニターし、特異的な変異をNopPに持つ根粒菌との共生（根粒形成）を拒絶していることが示唆された。