

学位論文題名

Structures and functions of consortia composed of limnic large sulfur-oxidizing bacteria (*Thioploca*) and their epibiont(湖沼に生息する大型硫黄酸化細菌 (*Thioploca*) と付着菌からなる群集の構造と機能)

学位論文内容の要旨

自然環境中に存在する微生物の多くは培養が困難であるため、個々の生理学的機能や物質循環への寄与について未解明な点が多い。細胞内に硝酸を蓄積する能力を持つ大型の硫黄酸化細菌は、水圏の堆積物表層付近に生息し、特定の条件下において高密度で生息する。生体を合成する主要な元素である窒素、硫黄、炭素の循環への影響が大きいと考えられているが、現在までに純粋培養株は得られておらず、その生理学的機能に関する知見は限られている。これらの硝酸蓄積硫黄酸化細菌の中で唯一淡水域に生息する *Thioploca* 属の細菌は、数十本のトリコームが共通のシースで覆われた形態をとる。湖沼は閉鎖性水域であるため、物質循環への寄与は海洋の生息地の場合よりも大きくなる可能性がある。しかし、淡水環境における研究例は海洋の場合に比べて少ない。本研究では、湖沼に生息する *Thioploca* の詳細な系統関係や生態学的、生理学的特性の解明を目的として調査を行った。

北海道千歳市のオコタンペ湖から発見された *Thioploca* の 16S rRNA 遺伝子の配列を決定したところ、青森県の汽水湖である小川原湖に生息する *Thioploca* と全く同一の配列が得られた。そこで、4湖沼（コンスタンツ湖、琵琶湖、小川原湖、オコタンペ湖）の試料について、23S rRNA 遺伝子および 16S-23S rRNA 遺伝子内部転写スペーサー（ITS）領域を対象とした系統解析を行った。その結果、小川原湖とオコタンペ湖の試料の間で配列の違いがみられた。また、コンスタンツ湖とオコタンペ湖の試料においては複数タイプの ITS 領域の配列が検出され、16S rRNA 遺伝子では検出されなかった多様性の存在が明らかとなった。

オコタンペ湖と琵琶湖に生息する *Thioploca* の現存量の測定を行った。現存量は堆積物の表層で多く、オコタンペ湖では深さ 5-8 cm 層まで、琵琶湖では 2-5 cm 層まで存在が確認された。また、オコタンペ湖の非常に狭い範囲において採取した 3 本の堆積物コア間で、0-2 cm 層の現存量が大きく異なったことから、水平的な分布は非常に不均一であることが示唆された。また、測定を行った環境要因と *Thioploca* の現存量の間に有意な相関はみられず、*Thioploca* の現存量を規定する要因は特定されなかった。

Thioploca と同様にシースを持ち海洋に生息する糸状性の硝酸蓄積硫黄酸化細菌は、シースに付着している糸状性の硫酸還元菌から硫化物の供給を受けていると考えられている。*Thioploca* と付着菌からなる微生物

物群集の物質循環に対する寄与を明らかにするためには、主なシース付着菌を特定することが重要であると考えられる。PCRによる増幅産物を用いた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法およびクロニング法により、*Thioploca*のシース付着菌の群集構造解析を行ったところ、異なる湖の試料から共通して互いに非常に近縁な*Chloroflexi*門の細菌が検出された。蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) 法により、この*Chloroflexi*門の細菌の形態および付着部位の特定を行った。その結果、それらは糸状体であり、*Thioploca*のシース内にトリコームと並行して大量に分布していることが示された。この細菌の近縁種には多糖類を分解して発酵を行う細菌が存在することから、付着している*Chloroflexi*門の細菌は、*Thioploca*のシースを炭素源やエネルギーとして利用しているのかもしれない。

熱帯に位置するカンボジアのトンレサップ湖において、*Thioploca*様の糸状性生物が採取されたため、形態観察および系統解析を行った。形態に関して既知の*Thioploca*の特徴を有することが確認された。クロニング解析より得られた16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子およびITS領域の配列は、全て他の湖の*Thioploca*と近縁であった。これらの結果から、トンレサップ湖から得られた糸状性生物は*Thioploca*属の細菌であることが示された。これまでに報告がある*Thioploca*の生息地は、温帯から亜寒帯の地域に限られていたが、熱帯域の湖沼にも分布していることが明らかとなった。また、これまでの報告では同一湖沼内に生息する*Thioploca*の16S rRNA遺伝子配列は単一であったが、トンレサップ湖の試料からは複数タイプの16S rRNA遺伝子配列が検出された。さらに、16S rRNA遺伝子配列の一つは既知の配列とは離れた位置に独自のクラスターを形成した。したがって、同一湖沼内においても16S rRNA遺伝子タイプが複数存在し、*Thioploca*属内の系統的多様性はこれまで考えられていたよりも高いことが明らかとなった。

プロテオーム解析により*Thioploca*の生理学的機能の推定を行った。生息環境において発現している機能を推定するために、オコタンペ湖より採取した直後にタンパク質を抽出し、プロテオーム解析に供した。その結果、硝酸から分子状窒素まで還元する経路の酵素が全て検出された。硫黄酸化経路に関しては、1) Sox pathwayと、2) rDsr pathwayおよびAdenosine phosphosulfate reductase (apr)からなる経路の2つの経路の酵素が検出された。また、ジメチルスルフォキシド(DMSO)還元酵素とcbb₃型シトクロムc酸化酵素が検出されたことから、DMSO呼吸および酸素呼吸活性を有することが示唆された。さらに、Calvin回路の鍵酵素であるRibulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)およびその関連酵素が検出されたことから、*Thioploca*がCalvin回路により炭酸固定を行っていることが推定された。また、微小電極を用いて細胞付近の酸素濃度の測定を行ったところ、細胞に近づくほど酸素濃度が低下する傾向がみられ、*Thioploca*の酸素呼吸能が支持される結果が得られた。

本研究では、湖沼に生息する大型硫黄酸化細菌*Thioploca*の系統的多様性と特定の付着菌の存在、そしてより広い気候帯に分布していることが明らかとなった。また、窒素、硫黄、炭素の代謝に関する生理学的機能が推定された。今後のさらなる研究により、系統関係と生理学的機能の関係性、生育を規定する要因、または付着菌の生理学的機能および*Thioploca*との相互作用の解明などが望まれるが、本研究で得られた結果は、これらの解明を行う際の重要な知見となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 井 学
副 査 教 授 森 川 正 章
准教授 笠 原 康 裕
助 教 小 島 久 弥
教 授 福 原 晴 夫 (新潟大学教育学部)

学位論文題名

Structures and functions of consortia composed of limnic large sulfur-oxidizing bacteria (*Thioploca*) and their epibiont

(湖沼に生息する大型硫黄酸化細菌 (*Thioploca*) と付着菌からなる群集の構造と機能)

自然環境中に存在する微生物の多くは培養が困難であるため、個々の生理学的機能や物質循環への寄与について未解明な点が多い。細胞内に硝酸を蓄積する能力を持つ大型の硫黄酸化細菌は、水圏の堆積物表層付近に生息し、特定の条件下において高密度で生息する。生体を合成する主要な元素である窒素、硫黄、炭素の循環への影響が大きいと考えられているが、現在までに純粋培養株は得られておらず、その生理学的機能に関する知見は限られている。これらの中で唯一淡水域に生息する *Thioploca* 属は、数十本のトリコームが共通のシースで覆われた形態をとる。硝酸蓄積能を有する大型硫黄酸化細菌全体の理解のためには、淡水環境における知見は重要であると考えられるが、その研究例は海洋の場合に比べて少ない。本研究では、湖沼に生息する *Thioploca* の詳細な系統解析および生態、生理学的特性に関する調査を行った。

北海道千歳市のオコタンペ湖の *Thioploca* の 16S rRNA 遺伝子配列は、青森県の小川原湖に生息する *Thioploca* と同一であった。そこで、4湖沼 (コンスタンツ湖、琵琶湖、小川原湖、オコタンペ湖) の試料について、23S rRNA 遺伝子および 16S-23S rRNA 遺伝子内部転写スペーサー (ITS) 領域を対象とした系統解析を行った。その結果、オコタンペ湖と小川原湖の試料間で配列の違いが検出された。また、コンスタンツ湖とオコタンペ湖の試料から複数タイプの ITS 領域の配列が検出され、16S rRNA 遺伝子では検出されなかった多様性の存在が明らかとなった。

オコタンペ湖と琵琶湖に生息する *Thioploca* の現存量の測定を行った。現存量は堆積物の表層 0-2 cm 層に最も多く、オコタンペ湖では深さ 5-8 cm 層まで、琵琶湖では 2-5 cm 層まで存在が確認された。また、オコタンペ湖より採取した 3 本の堆積物コア間で、0-2 cm 層の現存量が大きく異なったことから、水平的な分布は非常に不均一であることが示唆された。

Thioploca と付着菌からなる微生物群集の物質循環に対する寄与を明らかにするためには、

主なシース付着菌を特定することが重要であると考えられる。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、これまでに複数の湖沼の *Thioploca* シースから共通して検出されている *Chloroflexi* 門の細菌の形態および付着部位の確認を行った。その結果、糸状性で、*Thioploca* のシースにトリコームと並行して大量に分布していることが示された。この細菌の近縁種には多糖類を分解して発酵を行う細菌が存在することから、付着している *Chloroflexi* 門の細菌は、*Thioploca* のシースを炭素源やエネルギーとして利用しているのかもしれない。

熱帯に位置するトンレサップ湖において採取された *Thioploca* 様の糸状性生物の形態観察および系統解析を行った。形態に関して既知の *Thioploca* の特徴を有することが確認された。さらに、16S rRNA 遺伝子、23S rRNA 遺伝子および ITS 領域の配列は、全て他の湖の *Thioploca* と近縁であったことから、*Thioploca* が熱帯域にも分布していることが初めて示された。また、複数タイプの 16S rRNA 遺伝子配列が検出され、その中の一つは既知の配列とは離れた位置に独自のクラスターを形成したことから、同一湖沼内および *Thioploca* 属内の系統的多様性はこれまで考えられていたよりも高いことが明らかとなった。

プロテオーム解析により *Thioploca* の生理学的機能の推定を行った結果、生息地において、脱窒を行い、2つの経路により硫黄を酸化していることが示唆された。また、酸素呼吸および DMSO 呼吸活性を有し、炭素源としては CO_2 および酢酸を利用していることが示唆された。また、細胞付近の酸素濃度測定より、細胞に近づくほど濃度が低下する傾向がみられ、*Thioploca* の酸素呼吸能が支持される結果が得られた。

本研究の結果より、湖沼に生息する大型硫黄酸化細菌 *Thioploca* の系統的多様性と特定の付着菌の存在、そしてより広い気候帯への分布が明らかとなった。また、生息地における窒素、硫黄、炭素の代謝に関する生理学的特性が推定された。今後のさらなる研究により、系統関係と生理学的機能の関係性、生育を規定する要因、または付着菌の生理学的機能および *Thioploca* との相互作用の解明などが望まれるが、本研究で得られた結果は、これらの解明を行う際の重要な知見となることが期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。