

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

海底堆積物から分離された新種のClostridium属およびVallitalea属細菌の諸性状

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2024-05-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平野, 栞 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2000202.1">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2000202.1</a>

博士学位論文内容要旨  
Abstract of Dissertation

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	平野 栞
論文題目 Title	海底堆積物から分離された 新種の <i>Clostridium</i> 属および <i>Vallitalea</i> 属細菌の諸性状		

微生物の種数は 80 万から 160 万との推測がなされているが、この数値は環境 DNA のクローンライブラリー法やメタゲノム解析に基づくものであり、これら微生物の多くは純粋分離がなされていない。これまで未培養ながらメタゲノム解析などの結果からその存在が環境中に認められていた微生物が、培養方法の検討によって分離されたという報告は複数なされている。そのため、新種の微生物を純粋分離することは、新たな生物機能の発見やその利用に繋がるものとして期待されている。したがって、微生物の培養、分離手法の検討は、微生物学の重要な研究課題の一つである。

著者は博士前期課程において、2 種類の培地、すなわちメタン生成古細菌用の培地と嫌気性従属栄養細菌用の培地を組み合わせた培養、分離方法を用いることで、深海の海底堆積物から新種と思われる偏性嫌気性細菌を複数株分離し、予備的な性状試験を行った。そこで博士後期課程においては、これらの菌株について、研究室内で同様の手法で分離された菌株も併せて新種として学名を命名、提唱するため、より詳細な分類学的な位置の検討を行うこととした。また、これらの菌株についてはその特徴的な生物性状についても産業利用への可能性を検討することとし、さらに、本培養方法の新たな細菌種の純粋分離法としての有効性を考察した。

第 1 章では、本論文の研究背景およびその経緯について博士前期課程の結果とあわせて述べた。

第 2 章では、日本海佐渡島沖と北海道日高沖の海底堆積物から集積培養を経てそれぞれ分離された SH18-1 株と AN17-2 株について、デジタル DNA-DNA hybridization 解析、細胞の形態観察、生理・生化学的性状や菌体成分の分析などを行った。その結果、両株とも *Vallitalea* 属細菌の新種であることが判明した。また、菌株の分離された現場堆積物と菌株の分離後に冷蔵保存されていた集積培養液について、16S rRNA 遺伝子 V4 領域を対象にアンプリコンシーケンス解析を行った。その結果、現場堆積物中では、分離株の配列と一致するものは認められなかったが、集積培養液では、それと一致する配列が SH18-1 株で 1.3%、AN17-2 株では 0.2%認められた。これらの結果より、2 株は集積培養によってその培地中に増菌され、最終的な分離に至ったことが示唆された。また、2 株のドラフトゲノム解析の結果、近縁種である *Vallitalea guaymasensis* L81 株のゲノムに推定されている 2 種のアルカン分解関連酵素 (alkylsuccinate synthase, alkylsuccinate synthase activating enzyme) と類似のアミノ酸配列が認められた。そこで、これら 2 株のアルカン分解能を評価するために、3 種類の原油をそれぞれ添加した培地にて培養を行い、ガスクロマトグラフィーを用いて検討したところ、結果はばらつくものの分解能が期待された。分解能は短鎖のアルカンにおいてよく認められた。なお、SH18-1 株に関する研究成果は微生物分類学の専門誌である *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 誌に 2023 年に公表し、同株を *Vallitalea longa* と命名した。

第 3 章では、佐渡島沖の海底堆積物から集積培養を経て分離された SH18-2 株について、第 2 章の手法に準じ、デジタル DNA-DNA hybridization 解析やその他の性状試験を行い、本株が新種の *Clostridium* 属細菌であることを明らかとした。さらに、前章と同様に菌株が分離された現場堆積物と集積培養液について、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析を行った。その結果、現場堆積物中においては、SH18-2 株の配列と一致するものは認められなかったが、集積培養液にはそれと一致する配列が 8.2%認められた。したがって、本株も集積培養の過程でその培地中に増菌され、最終的な分離に至ったことが改めて示唆された。また、本株を原油添加培地にて培養したところ、原

油の凝集が認められた。

第4章では、新たな堆積物のサンプリングを行い、前章までに示した培養方法に準じて菌株の分離を行った。その結果、三浦半島先端の城ヶ島の干潟堆積物から、通性嫌気性である *Vibrio* 属の新種と推定される菌株が分離されたことに加え、第2章において新種であることを明らかとした *V. longa* SH18-1<sup>T</sup> 株とほぼ同一の 16S rRNA 遺伝子の配列を有する菌株が2株分離された。このことから、*V. longa* は深海の堆積物のみには存在するのではなく、干潟にも存在していることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究にて用いられた手法は、新種の偏性嫌気性細菌や通性嫌気性細菌を分離する方法の1つとして有効であることが示唆された。また、海洋においてはしばしば原油や石油製品による流出事故が引き起こされている。SH18-1 株と AN17-2 株にはアルカン分解が期待された。また、SH18-2 株には原油凝集の活性も認められたため、現場環境における流出物を微生物によって処理する技術へのこれら菌株の活用が期待された。