

# 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>

博士学位論文要約  
Summary of Dissertation

専攻 Major	応用生命科学	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		

平板培地を用いた微生物の分離方法の発見から 100 年以上が経過し、その間に約 23000 種の真正細菌と古細菌の学名が記載された。しかしながら、現在、地球上に生息する微生物の種類は 80 万から 160 万種におよぶと推測されており、その中でも分離、培養がなされた種類は、0.1 から 1.0%程度と考えられている。これまで未培養ながらクローンライブラリー法や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、新たな生物活性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、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という、2 種類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、これらの株について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も検討した。

本論文では、まず、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示した。

次に、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 ハイブリダイゼーション解析、細胞の形態観察、生理・生化学的性状や菌体成分の分析を行い、結果を取りまとめた。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、集積培養液においてはそれと一致する配列が SH18-1 株で 1.3%、AN17-2 株では 0.2%で認められた。これらの結果から、両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、両株のゲノムアノテーションの結果、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) と類似する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短鎖のアルカンにおいて分解能が期待された。

また、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、前述の手法に準じて、デジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析、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、佐渡島沖の現場堆積物とその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培地中に増菌し、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。

さらなる実験として、新たに堆積物のサンプリングを行い、上記と同様の培養手法に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、本研究で佐渡島沖の海底堆積物から分離された新種である *Vallitalea longa* SH18-1<sup>†</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。

なお、本論文の内容の一部は、以下の学術誌に受理済みであり、2023 年 73 号に公開された。

\*Shiori Hirano, Takeshi Terahara, Koji Mori, Moriyuki Hamada, Ryo Matsumoto and Takeshi Kobayashi, *Vallitalea longa* sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from marine sediment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2023;73:005882