HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Phylogenetic and functional analysis of novel bacteria isolated from aquatic environment [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	渡邊, 美穂
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第12220号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62106
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Miho_Watanabe_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名　　渡 邊 美 穂

学 位 論 文 題 名

Phylogenetic and functional analysis of novel bacteria isolated from aquatic environment
（水圏環境から分離した新規細菌の系統分類と機能解析）

細菌をはじめとする微生物はきわめて高い生理生化学的多様性を有しており、その代謝活動は地球規模の物質循環に大きな影響を及ぼしている。また細菌は系統学的な多様性も非常に高い。細菌の正式な分類と命名、および細菌の有する機能や性質の解明は、細菌を分離培養することによってのみ実現する。しかしこれまでに分離培養された細菌種の数は細菌全体のうちわずかでしかない。本研究では水圏環境から新規細菌を分離培養し、得られた新規細菌株の系統分類と機能解析を行うことを目的とした。

skLN1 株は淡水湖堆積物を接種源とする培養系より得られた新規通性嫌気性細菌である。skLN1 株の細胞は桿状であり、その長さは 5-100 μm とばらつきが大きかった。系統学的解析により、skLN1 株は *Bacillus* 綱 *Alicyclobacillus* 属の *A. pohliae* と *A. consociatus* を近縁種とすることが示された。*Bacillus* 目全体を網羅する系統樹の分岐パターンから *Alicyclobacillus* 属はその単系統性が失われていることも明らかになった。skLN1 株は *A. pohliae* と *A. consociatus* と共に、大多数の *Alicyclobacillus* 属細菌と大きく離れたひとつの系統群を形成した。skLN1 株および *A. pohliae* と *A. consociatus* は全て中性付近の pH で最適に増殖したが、一般的な *Alicyclobacillus* 属細菌は全て酸性を好む性質があった。以上のことから、skLN1 株を新属新種細菌 *Effusibacillus lacus* として記載すると共に *A. pohliae* と *A. consociatus* の 2 種を *E. pohliae*、*E. consociatus* として再分類することを提唱した。

Pf12B 株は汽水性部分循環湖堆積物を接種源とし、石油系炭化水素を唯一の基質として加えた培養系より得られた新規硫酸還元細菌である。系統学的解析により Pf12B 株は *Deltaproteobacteria* 綱 *Desulfovibrio* 目 *Desulfomicrobium* 科に属していることが示された。*Desulfomicrobium* 科は *Desulfomicrobium* 属のみを含む分類群であったが、Pf12B 株およびこれに近縁な環境配列はこの科内で独立した一つの系統を形成しうることが示された。すべての *Desulfomicrobium* 属細菌は短い桿状の細胞形態を有し、デサルフォビリジンという酵素を持たないことが知られている。しかし Pf12B 株の細胞は運動性を持つらせん型であり、さらにデサルフォビリジンを保有していることが示唆された。デサルフォビリジンは *Desulfovibrio* 目においては *Desulfovibrio* 科の一部系統の細菌のみがこれを保有することが分かっており、この有無は硫酸還元細菌の化学分類における重要な指標である。*Desulfomicrobium* 科に属すにもかかわらずこれを有する新規細菌を得たことは分類学的な意義が大きい。生理学的にも近縁種とは異なる点が多いため、Pf12B 株を *Desulfomicrobium* 科の新属新種細菌 *Desulfoplanes formicivorans* として提唱した。

南極海洋沿岸堆積物を接種源とした培養系より、新規通性嫌気性細菌 SPP2 株を得た。SPP2 株は系統学的解析により *Bacteroides* 門 *Bacteroides* 綱の *Marinifilum* 科に属することが明らかになった。SPP2 株は系統樹上において近縁な環境配列とともに *Marinifilum* 属

の側系統となる独立した系統群を形成した。既知の *Marinifilum* 属の細菌種はすべて中温性の細菌であったが、SPP2 株は 0-25℃の間で増殖し 18-22℃を至適温度とする通性好冷性細菌であった。SPP2 株は有機物の利用性についても近縁種とは大きく異なった。これらの特徴に基づき、SPP2 株を *Marinifilum* 科における新属新種である *Algorifilum antarcticum* として提唱した。

汽水性部分循環湖堆積物を接種源とし、唯一の基質として石油系炭化水素を添加した集積培養系より新規細菌 HC45 株を純粋分離株として得た。HC45 株は最近縁種（*Firmicutes* 門 *Clostridium* 綱に属する細菌）との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 85%以下と非常に低かった。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づき *Firmicutes* 門全体にわたる系統学的解析を行った結果、HC45 株は近縁な環境配列とともに既存の系統群から独立した系統学的位置にあることが示された。HC45 株は中度好熱性細菌で、糖や有機酸などを用いて生育した。HC45 株の細胞形態は球状-桿状-糸状と多様で、細胞の長さは 10-100 μm と様々に変化した。走査型電子顕微鏡による解析の結果、細胞表面には細い毛のような構造が密に存在することが確認された。一般に *Firmicutes* 門細菌のゲノム DNA の G+C 含量は高くとも 50%前後である。しかしながら HC45 株の G+C 含量は 70%と細菌全体の中でもきわめて高い値を示した。HC45 株と系統的に関連がある細菌群が属している *Clostridia* 綱は偏性嫌気性細菌のグループであるが、HC45 株は通性嫌気性であることが示された。HC45 株の系統的独立性と生理生化学的性質に基づき、*Firmicutes* 門における新綱新目新科新属新種細菌 *Limnochorda pilosa* として提唱した。

HC45 株の完全ゲノム配列の解読と詳細な形態学的解析、および詳細な系統学的解析を行った。透過型電子顕微鏡写真による解析の結果、HC45 株の細胞壁構造と細胞分裂様式はグラム陰性細菌型であり、内生胞子を形成することが示された。しかし一般的な *Firmicutes* 門細菌の内生胞子形成に必須な遺伝子セットと HC45 株のゲノム情報を比較したところ、HC45 株はそれらの遺伝子をいくつか欠いていることが示された。そのため、HC45 株は既知の胞子形成性細菌とは異なる胞子形成機構を保有することが示唆された。また HC45 株のゲノム上にはグラム陰性型構造の鞭毛の合成に関与する遺伝子群が存在することも示された。HC45 株は細菌の細胞分裂に必須とされるタンパク質をコードする遺伝子が非常に多く欠失していることが示された。リボソームタンパク質や 23S rRNA 遺伝子塩基配列を用いた系統解析により、*Firmicutes* 門における地位不確定ないくつかのメンバーと HC45 株には類縁関係が有り、それらは独立したひとつの系統群を形成しうることが示された。以上のことから、新綱 *Limnochordia* に属する細菌 HC45 株は、グラム陰性胞子形成性細菌であることが示された。