

3P-107 次世代シーケンサーによる微生物混合培養系菌叢解析技術の開発と揮発性有機塩素化合物分解系への利用

○池上 健太郎¹, 武知 文音¹, 北嶋 瑞樹¹, 岩本 めぐみ^{1,2}, 福田 智美², 田村 紀義², 佐藤 万仁³, 照屋 邦子³, 保 日奈子³, 下地 真紀子³, 中野 和真³, 新崎 文香³, 城間 安紀乃³, 青山 みさ子³, 寺林 靖宣³, 照屋 盛実⁴, 平野 隆^{3,5}, 養王田 正文¹ (¹農工大院・工・生命工, ²PaGE Science, ³沖縄総合科学研究 所, ⁴沖縄県工業技術セ, ⁵沖縄科学技術振興セ) kentaro.ikegami@yohda.net

近年、クロロエテン類による土壌、地下水汚染の浄化に有用微生物を用いた浄化技術であるバイオレメディエーションが実用化されつつある。バイオレメディエーションを実施するに当たり、菌叢モニタリング技術が菌叢制御や環境への影響評価法の確立に必須であるが、現在有効な菌叢モニタリング技術が確立されていない。本研究では、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を応用し新たな菌叢解析手法の構築を行った。次世代 DNA シーケンサー SOLiD で得られた read 配列の 16S rRNA 遺伝子データベースとの比較定量により、コンソーシア中に存在する微生物の種類とその存在比を算出した。また、トリクロロエテンで汚染された地下水を集積培養して得た *Dehalococcoides* 属細菌含有コンソーシアを対象に菌叢解析を行いこの解析技術の評価を行った。

Method for the analysis of bacterial consortia using next generation sequencer and application for that involved in dechlorination of chloroethenes.

○Ikegami Kentaro¹, Takechi Ayane¹, Kitajima Mizuki¹, Iwamoto Megumi^{1,2}, Fukuda Tomomi², Tamura Noriyoshi², Satou Kazuhito³, Teruya Kuniko³, Tamotsu Hinako³, Shimoji Makiko³, Nakano Kazuma³, Arasaki Ayaka³, Shiroma Akino³, Aoyama Misako³, Terabayashi Yasunobu³, Teruya Morimi⁴, Hirano Takashi^{3,5}, Yohda Masafumi¹ (¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²PaGE Science, ³Okinawa Inst. Adv. Sci., ⁴Okinawa Ind. Technol. Ctr., ⁵Okinawa Sci. Technol. Promo. Ctr.)

Key words next generation sequencer, microbial flora

3P-109 水圏の環境メタボノミクス技術高度化の試み

○霞田 征司¹, 赤間 真樹子², 伊達 康博^{1,2}, 菊地 淳^{1,2,3,4} (¹横市大院・生命ナノシステム, ²理研・CSRS, ³理研・BMEP, ⁴名大院・生命農学) seiji.y_817@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

河口環境生態系は、ヒトの生存にとって必要不可欠な様々な物質や機能を創成し、人類はその多大なる恩恵を享受している。このような貴重な河口環境生態系を維持し、持続的に享受し続けるためには水圏環境評価技術が重要であり、種々の環境要因を反映した水棲生物の生体成分変動や恒常性評価から、水圏環境の本質を知ることができると著者らは考えている。本研究ではこれまで、NMR メタボローム解析および ICP イオノーム解析を用いて、魚類各器官における代謝物プロファイルおよびミネラルプロファイルの評価するとともに、各河川の環境情報を反映した魚類代謝プロファイリング技術の構築を推進してきた。しかしながら従来の NMR メタボローム解析では、魚類のようなタンパク質由来高分子成分が多く検出されるサンプルにおいてはオーバーラップシグナルによる物質検出・同定の問題が生じるとともに、水溶媒を用いた抽出では親水性代謝物のみしか評価することが出来なかった。そこで本研究では、水溶媒に加えメタノール溶媒を用いて代謝物の抽出を行うとともに、それぞれの溶媒に対して CPMG 法、WATERGATE 法、2D JRES NMR 法の三種類の NMR パルスシーケンスプログラムによる計測方法を用いて評価することで、オーバーラップ領域における高分解能化を実現するとともに、より多くの代謝物情報を取得することに成功した。さらに、水圏環境評価のためのプローブ生物として着目したマハゼに対して、本計測法を用いて各河川の評価を行い、得られた各スペクトルデータの統合解析結果についても本会で議論したい。

Technical advancement for aquatic environmental metabonomics

○Seiji Yoshida¹, Makiko Akama², Yasuhiro Date^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2,3,4} (¹Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., ²RIKEN, CSRS, ³RIKEN, BMEP, ⁴Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words NMR, Environmental metabonomics, Ionomics

3P-108 Analysis of bacterial community for sulfur cycle in conserved tidal flats in Ariake sea

○Irfan Mustafa¹, Takao Yoshihara¹, Shigeru Morimura¹, Hiroto Ohta¹, Takuro Niidome¹, Tatsuya Masuda², Kiyoshi Takigawa³ (¹Grad. Sch. Sci. Technol., Kumamoto Univ., ²Prior. Org. Innov. Excel., ³Ctr. Marine Environ.) morimura@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Tidal flats of Ariake sea are in a concern over the sulfide concentration exceeding tolerable limit for favorable condition of animal's life. Sulfide is mainly produced by sulfate-reducing bacteria (SRB) while decomposing organic matter. Naturally, sulfide is reoxidized by coexisting sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and creating a balanced sulfur cycle. Human activities on the environment affect the composition of bacterial communities. Sediment samples from conserved tidal flats, the mudflat Midorikawa and the sandflat Shirakawa, were examined to reveal the structure of sulfur bacterial communities. Culture-independent approach was applied to obtain a clone library from the sediments extracted DNA. The library was built based on a marker gene which is responsible in both sulfur oxidation and reduction, the *aprA* gene. The 175 clones were identified as members of alpha-, gamma- and deltaproteobacteria. Six clones were identified as SRB, while the others were identified as SOB. About two-thirds of the SOB clones were identified as uncultured gammaproteobacterial FM879003. This indicated that the FM879003 related SOB were dominant among sulfur bacteria at both area and might play an important role at Ariake Sea tidal flats.

Analysis of bacterial community for sulfur cycle in conserved tidal flats in Ariake sea

○Irfan Mustafa¹, Takao Yoshihara¹, Shigeru Morimura¹, Hiroto Ohta¹, Takuro Niidome¹, Tatsuya Masuda², Kiyoshi Takigawa³ (¹Grad. Sch. Sci. Technol., Kumamoto Univ., ²Prior. Org. Innov. Excel., ³Ctr. Marine Environ.)

Key words sulfur bacteria, tidal flat, Ariake sea

3P-110 石油分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 のバイオレメディエーション中における挙動解析

○久保 幹, 堀口 悠, 大概 祐人, Adhikari Dinesh, 向 真樹 (立命館大・生命科学・生工) kubo@sk.ritsumeit.ac.jp

【背景・目的】
Rhodococcus erythropolis NDKK6 は当研究室で単離したグラム陽性菌である。*R. erythropolis* NDKK6 は難分解性炭化水素であるシクロヘキサンおよびアルキルシクロヘキサンの分解能を有することがわかっている。*R. erythropolis* NDKK6 は、アルキルシクロヘキサンを唯一の炭素源として利用可能であり、その代謝経路も特定されている。また、*R. erythropolis* NDKK6 はアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子 (*alkB* 遺伝子) を有していることがわかっているため、バイオレメディエーションに有用な菌株であると考えられた。本研究では、*R. erythropolis* NDKK6 の持続的なバイオレメディエーションを行う条件検討と難分解性炭化水素の分解能評価を行った。

【方法・結果】
総炭素量 (TC) を 16,000 mg/kg、総窒素量 (TN) を 1,600 mg/kg に調整した土壌に、*R. erythropolis* NDKK6 は、 1×10^8 cell/g-soil になるように調整した細胞懸濁液および 5,000 mg/kg のドデシルシクロヘキサン (DDC) を加えてバイオレメディエーションを行った。その結果、42 日後の DDC 濃度は、*R. erythropolis* NDKK6 を接種した場合には約 26%、未接種の場合には約 44% が残留していた。このとき、*R. erythropolis* NDKK6 の菌数は、接種した場合、21 日後まで増え続け、42 日後には数えられないほどに減少した。総細菌数は *R. erythropolis* NDKK6 を接種した場合、および未接種の場合に 42 日後には増加する、という結果が得られた。DDC に代えて自動車エンジンオイルでも同様な実験を行ったところ同様な結果が得られた。

Dynamics of *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 during bioremediation.

○Motoki Kubo, Yu Horiguchi, Yuto Otsuki, Dinesh Adhikari, Masaki Mukai (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words bioremediation