T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	┃ 未知状況を含む微生物共生系の制御	
Title(English)	Control of contingent microbial ecosystem	
著者(和文)		
Author(English)	Akifumi Nishida	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10870号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,小長谷 明彦,青西 亨,田川 陽一,瀧ノ上 正浩	
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10870号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,	
 学位種別(和文)	 博士論文	
Type(English)	Doctoral Thesis	

学位論文

未知状況を含む微生物共生系の制御

平成三十年三月博士 (工学) 申請

- 指導教員 山村雅幸 教授
- 氏名 西田暁史

論文要旨

微生物は多様な機能を持って元素循環を担い、人類は昔から今日まで物質生 産・処理にその機能を利用してきた。物質生産・処理において単一種の微生物 ができることには限界があり、個々の微生物の負担を減らしつつ機能を発揮す る微生物共生系が注目されている。しかし、微生物共生系は微生物個体がゆら ぎを持つことに加え、それらが複雑に組み合わさることで共生系の挙動は予測 不可能で未知状況を含むものとなっている。本研究ではこのように未知状況を 含む微生物共生系を利用するために、それを制御する枠組みを構築する。具体 的には、微生物による物質生産・処理系で注目されている光入力を用いたうえ で、①共生系制御を想定した単一種の微生物集団の制御、②微生物多種共生系 の入力応答の計測という要素技術に注力した。①単一種の微生物集団の制御で は、微生物共生系の制御を見越した制御システムを構築し、まずはシンプルに 単一集団を相手とした制御を行った。微生物には光応答の Cph8-OmpR システム を組み込んだ大腸菌を使用し、光によって調節される遺伝子発現量を動的に制 御した。未知状況を含む微生物共生系を制御するには、定期的な出力の測定と フィードバックによる修正が重要となるため、モデル予測制御と非線形カルマ ンフィルタを組み合わせて制御システムを構築した。非線形なモデルを扱える ため、菌叢や環境中の代謝物量もフィードバックに使える拡張性を持っている。 結果、Cph8-OmpR システムが出力するタンパク質濃度を sin 波目標値へ動的に 制御することに成功した。制御システムの雛型ができたので、次に②微生物多 種共生系の入力応答の計測を行った。これは天然環境の種が豊富な微生物共生 系に対して、特定の微生物を活性化したときに他の微生物がどれくらい影響を 受けるか評価した実験で、これにより微生物共生系の可制御性に目安をつけら れるようになる。この実験では多細胞生物が存在しない純粋な微生物共生系で ある温泉中の微生物マットを実験対象とし、そのマットを構成する主要な3種 の光合成細菌に狙いをさだめ、それぞれが吸光する光波長を独立に照射した。 16S rRNA 遺伝子解析の結果から、それぞれの光合成細菌を個別に増殖させるこ とに成功したことと、それらの光合成細菌の増加に伴ってマットコミュニティ の多様性やそれぞれの微生物が受けた影響が分かった。そしてその結果、環境 の栄養状態に依存するが、特定の微生物を活性化しても全ての微生物に影響を 与えることはできず、制御対象となる共生系の可制御性を考慮することが必要 となることが分かった。これらの要素技術と既存の手法を利用した共生系モデ ルの構築により、光合成細菌を介して微生物共生系を動的制御し、トレードオ フが発生する微生物共生系の最適化に役立つであろう。

目次

第−	−章:	微	生物共生系制御について5
1	.1 -	背景	t5
	1.1.	.1	微生物共生系の利用5
	1.1.	.2	未知状況を含む微生物共生系
	1.1.	.3	微生物共生系の制御7
1	.2 7	研究	2目的と論文の構成8
第□	二章:	:東·	一種の微生物集団の制御9
2	.1 ž	導入	\$
2	.2 1	材料	↓と方法10
	2.2.	.1	株とプラスミド10
	2.2.	.2	パルス幅変更による応答実験11
	2.2.	.3	ハルス周期変更による応答実験12
	2.2.	.4	動的制御実験12
	2.2.	.5	蛍光測定13
	2.2.	.6	Cph8-OmpR システムの数理モデル13
	2.2.	.7	パラメータ同定のための Genetic Algorithm14
2	.3	結果	と考察14
	2.3.	.1	パルス幅変更による応答結果14
	2.3.	.2	Cph8-OmpR システムのモデリングとパラメータ同定15
	2.3.	.3	Cph8-OmpR システムの動的制御16
2	.4	まと	: め
Ž	図表		

第三章: 天然の微生物多種共生系の入力応答の計測	24
3.1 導入	24
3.2 材料と方法	25
3.2.1 微生物マットの採取場所と採取方法	25
3.2.2 光照射	26
3.2.3 DNA 抽出と PCR 増幅、そしてシーケンシング	27
3.2.4 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた種情報の割り当て	27
3.2.5 微生物多様性の解析	28
3.3 結果と考察	29
3.3.1 微生物マットの in situ 培養後の変化	29
3.3.2 培養後の微生物マット、初期マット、温泉水でのバクテリア多様性	31
3.3.3 培養マットでのばらつきと温度の影響	32
3.3.4 暗闇条件での微生物マットコミュニティ	33
3.3.5 光波長が微生物マットの多様性に与える影響	34
3.3.6 光が影響を与える特定の微生物	35
3.3.6.1 光合成細菌への光波長の影響	35
3.3.6.2 化学合成細菌への光波長の影響	37
3.3.7 温泉水	39
3.4 まとめ	40
図表	42
第四章:総合討論	66
4.1 結果のまとめ	66
4.2 考察	67
4.2.1 微生物共生系のモデル	67
3.2.2 光受容微生物をマスター菌とした微生物共生系の制御	69
4.2 展望:微生物共生系制御の物質生産・処理への応用	70

図表		72
公表諸	☆	73
参考↓		74
2 17		• •
謝辞		87

第一章:

微生物共生系制御について

1.1 背景

1.1.1 微生物共生系の利用

微生物は海洋・土壌・大気・生命体内と様々な場所で生息し、微生物間で相 互作用しながら元素を循環させている(1,2)。この微生物共生の働きは生命にとっ て重要で、微生物が絶滅すると食糧難となり、人間の文明は1年以内に崩壊す ると思考実験されているほどである(3)。微生物は能動的にも利用されており、 古くは発酵製品、近年では化学的製造法で作られてきた有機化合物でさえも微 生物に作らせている。微生物による物質生産は化学合成に比べ一般的に消費エ ネルギーが少なく、原料費も安く、欠点としては製造工程での挙動を安定させ にくいということがある(4)。また、互いに作れないものもある。代謝工学では 微生物に効率よく物質生産をさせるために、遺伝子の欠損や変異を導入するこ とで代謝経路の最適化が行われてきた。

微生物は何かを作ることにより負荷がかかり成長速度が下がり、作るものに よってはそれ自体が微生物にとって毒となることもあり、微生物による物質生 産と微生物負荷にトレードオフの関係がある。このようにトレードオフの関係 があるとき、微生物を動的制御することが役立つ。誘導剤のような外部入力に より制御するは多々あるが、コストがかかるため誘導剤を使わない、機能を動 的に自律制御する微生物を遺伝子組み換えによって開発し、成長フェーズと製 造フェーズを上手く切り替える戦略もとられている。機能を動的に自律制御す る機構は大まかに2つあり、1つは目的産物の材料となる物質の濃度に応じて 生産機能を ON にするもので、もう1つは菌密度に応じて生産機能を ON にする ものである。前者は、脂肪酸濃度に応じて脂肪酸エチルエステルを生産する大 腸菌(5)や、グルコースに応じて生分解性プラスチックの生産スイッチを ON に する大腸菌(6)が開発された。後者は細胞間シグナルによって菌密度を計測する 手法を取り入れたもので、菌密度が高まり良く増殖した後にイソプロパノール を合成する大腸菌(7)や、イノシトールやグルカル酸を合成する大腸菌(8)が開発 された。

このように 1 つの微生物に複雑な機能を持たせる研究が進められているのと 同時に、複数の微生物を組み合わせて機能を果たす共生系も研究されている。 合成生物学的手法では外来の遺伝子を用いて遺伝子パーツを用意し、その遺伝 子パーツを組み合わせることによって 1 つの微生物により高次な機能を実現す ることができ、上述の自律制御機能をはじめとした様々な拡張機能が開発され ている。しかし、この合成生物学的手法で 1 つの微生物に複雑な機能を持たせ ることには2つの問題点がある(9,10)。1つ目は、1細胞内での構成要素の種類が 多くなりクロストークの影響が大きくなり、所望の機能を果たすことが難しく なる点である。クロストークしない直交性を持つ遺伝子パーツが多数開発され てきたが、それでも1細胞の中に2段のロジック回路を構築できただけであっ た(11.12)。合成生物学の醍醐味である遺伝子パーツをモジュール化し、それらを 組み合わせることで高次の機能を持たせるということができなくなってしまう。 2 つ目は、発現物質が多くなることにより成長の負荷が大きくなることである。 これらの問題点を克服するために、複数の微生物による分担作業が研究されて いる(9.10)。例えば、より簡単な機能を複数の微生物に持たせ細胞間シグナルに よってそれら機能を接続することができ、XOR のように微生物単体に持たせる には難しい機能を共生系として実現できている(13.14)。現在利用されている物質 生産・処理でも微生物共生系が役立っており、メタン菌とその共生菌によるメ タンガス生成、麹カビ・酵母・乳酸菌などによる伝統的な日本酒醸造、活性汚 泥による排水処理などがある。

このような物質生産・処理系の制御では光入力が注目されている。光入力の 大きな利点は、誘導剤のコストがかからないということである。また、環境中 への残留がなく、即時に対象に届くという点で扱いやすく、制御入力に向いて いる。細胞間シグナルのような分子をそれぞれの細胞の入力と出力に使う際に は「入力ー出力マッチング問題」が生じると Chang は述べている(10)。これはあ る遺伝子パーツ/細胞の出力を別の遺伝子パーツ/細胞が入力として扱うとき に、それらが想定している分子の種類や濃度幅がマッチングしていなければな らないという問題である。その問題に対して、Chang はそれぞれの出力を蛍光物 質として測定し、必要に応じた入力量を光波長として外部から照射するという 手法を提案している。また、炭素や窒素固定能を持つシアノバクテリアを光入 力で制御しバイオ燃料など有用物質を生産させることは、環境問題と相まって 盛んに研究されているし、資源が制約されている宇宙空間での物質生産を模索 するアストロバイオロジーの分野でも注目されている(15)。ここでは我々は、微 生物の共生系による物質生産、それが動的に制御されること、さらに光入力が 有用であることを述べた。

1.1.2 未知状況を含む微生物共生系

微生物共生系を利用するにあたっての問題点は、共生系が偶発性を持つこと

である。偶発性とは、過去のランダムなものごとによる永続的な影響である。 緑藻である Chlamydomonas reinhardtii、グラム陰性バクテリアの Escherichia coli、 繊毛虫である Tetrahymena thermophila の3種を mL スケールの閉鎖系で培養した ときに、初期状態がほとんど同じでも、「ゆらぎ」によって最終状態は異なる ということが確認されている(16)。バクテリアと主に9種のプランクトンからな る海洋中の共生系では、多様な種が相互作用する複雑性からそれぞれの存在量 がカオス振動していることも確認されている(17)。また、花の蜜に生息し送粉者 によって輸送される複数種の酵母による共生系では、酵母たちが連続培養系へ 侵入する順番によって最終状態が異なるということが確認されている(18)。この 過渡状態でのゆらぎの影響、カオス振動、順序性による共生系状態の変化はど のような共生系でも起こるわけではなく、系を構成している微生物や環境に依 存する。しかし、共生系は偶発性により状態が変わりうるというのは重要な問 題である。

また、個々の微生物自体がゆらいでいる。微生物個体のノイズは細胞外の環境に起因する成分もあれば、外部環境が全く同じでも細胞内で生じるノイズ成分もあり、多様な表現型が現れる(19,20)。開放系であればさらに環境変動も起こるが、微生物はその環境にさえも影響を与えている。微生物ははじめに述べたとおり炭素、窒素、硫黄、リンなど元素循環のキープレイヤーであり、多種多様な環境を生み出している。

このように、微生物はそれ自体がゆらいでいるし、ゆらいだ状態で環境をも 変動し、さらには共生系という複数の微生物が絡み合う複雑系の特性でも系を 予測不可能なのもとする。微生物共生系が持つこれらの性質から、微生物共生 系は未知状況を含んでいるとした。

1.1.3 微生物共生系の制御

微生物共生系は偶発性や微生物自体のゆらぎ、環境への作用により未知状況 を含むものとなっている。また、第四章で述べる「メタンガス生成に関する共 生系」のようにヒトにとって好ましくない状態が安定点となっている場合もあ る。そのような向かっている状態が分からない系や、目標とは異なる安定状態 に向かっている系は、動的制御によってヒトが必要とする状態に収める必要が ある。そのためには、未知状況を含む微生物共生系に対応するため定期的な出 力の測定とフィードバックによる予測モデルへの反映が重要となる。微生物共 生系の動的制御はこれまで報告されていないが、単一種の動的制御はいくつか 報告例がある。大腸菌ではフィードバックを行わないオープンループ制御では あるが、光強度や光パルスによって遺伝子発現産物の目標値制御を行った研究 がある(21,22)。しかしフィードバックを行わないので、未知状況を含む微生物共 生系には対応できないという問題がある。酵母では入力として分子濃度を使っ て、フィードバック制御である PI 制御やモデル予測制御によって遺伝子発現産 物の目標値制御が行われた(23,24)。しかし、高価な誘導剤を外部入力として用い ることはコスト面で問題がある。これらは微生物単種を想定した制御であり、 我々は未知状況を含む共生系の制御のために、まずフィードバック制御が必要 となる。さらに、物質生産・処理での光入力の有用さに着眼し、光入力によっ て制御する。

1.2 研究目的と論文の構成

本研究の目的は、微生物共生系を制御することである。そのためにこの目的 を、①共生系制御を想定した単一種の微生物集団の光入力によるフィードバッ ク制御、②天然の微生物多種共生系の入力応答の計測、という要素技術に分割 してそれぞれを達成することとした。①では多種共生系を制御するための制御 システムを構築し、まずはよりシンプルな単一種集団を対象として、その性能 を試験する。②の必要性は、これまで微生物の多種共生系に対して例えば光の ような入力が菌叢にどのような影響を及ぼすか、天然環境の観察的評価はあっ ても、人工入力を印加して能動的に影響を評価することが試みられておらず、 特定の微生物の活性化を介してどれほどの微生物を制御できるのか微生物共生 系の可制御性の評価が必要であったからである。多種共生系を用いる理由とし ては、より複雑で未知状況を含む微生物共生系であるため試験対象として魅力 的であるためである。天然の微生物共生系である必要性は、ヒトが人工培地で 培養すると現在の技術ではほとんど(一説には 99%)が死滅し、多様性が失わ れてしまうためである。

本研究では第二章と第三章でそれぞれの要素技術、①単一種の微生物集団の 光入力によるフィードバック制御、②天然の微生物多種共生系の入力応答の計 測についての実験結果と考察を述べる。そして第四章では、それぞれの要素技 術と目的である「微生物共生系の制御」の間に必要となる技術を議論し、第二 章と第三章の結果を基としてどのようなことができるか展望を述べる。

第二章:

単一種の微生物集団の制御

2.1 導入

この章では共生系制御を想定して「単一種の微生物集団の制御」を行う。こ れにより、フィードバック制御や光入力を組み合わせた共生系制御のための制 御システムの雛型を作るとともに、マスター菌の代謝系を光入力によって動的 に制御できることを示す。第一章で述べたように共生系は未知状況を含んでお り、モデルによる予測と出力のフィードバックが重要となる。そこで我々は、 光入力によって光受容微生物を活性化し、サンプリング周期間を補完するため のモデルによる予測とモデルと現実の誤差に対応するための測定値のモデルへ のフィードバックにより、その代謝系を動的に制御する。細胞機能の動特性を 把握することは制御という応用のために役立てられていて(21-27)、動的制御の ためには制御対象である光受容微生物の持つ機能の動特性を把握することが必 要となる。しかし動特性を把握することは制御だけでなく、動特性を把握した 機能を生物に組み込むことにより、例えば出芽酵母の出芽の数や極性を調節し たり(28)、マウス発生過程で体節の数を調節することに成功していたりと(29)、 様々な場面に応用することができる(30-33)。合成生物学的に開発された機能の 動特性や、微生物の制御手法を新たに把握したり開発したりすることは、応用 できることの多様性を広げるという点で重要である。

この章での実験において制御する機構は、基本的な生命システムである Two-component system (TCS) とした。TCS は環境シグナルをセンサーキナーゼ によってセンシングし、細胞内コンポーネント(レスポンスレギュレータ)を リン酸化/脱リン酸化することによって情報を伝達する機構である(34,35)。TCS は微生物が自然界を生き抜くためのコアシステムなだけでなく、入出力システ ムとして工学的にも有用で合成生物学の分野で開発が進められている(36,37)。

天然の TCS のように生命機能は分子濃度を入力として扱うことが一般的だが、 光をセンシングし情報伝達する機能は、細胞がもともと持つ情報伝達系を調節 しその特性を調べるために有用である(38)。光入力は他の分子入力などよりも精 密さとターゲットへの即時性で優れている。別の長所としては化学物質にある ようなシグナル残留がないことが挙げられる。それに加え、光入力は光の強さ や波長など入力手法が多様である(21,26,27)。合成生物学の分野では、光合成細 菌から光センシングパーツを取り出し他の細胞に移植することに成功している。 その上さらに、外来の光センサーと内在のコンポーネントを組み合わせたキメ ラシステムが開発されている(38,39)。

我々は光入力により遺伝子発現を調節する TCS として Cph8-OmpR システム を対象に動特性を把握し、それを内蔵した大腸菌の内部状態を動的に制御した。 センサータンパク質である Cph8 とレスポンスレギュレータである OmpR から成 る Cph8-OmpR システムは、最も研究されている TCS の一つで浸透圧調節シス テムである EnvZ-OmpR のセンサータンパク質 EnvZ をシアノバクテリア由来の 光センサーCph1 に置き換えることにより開発された(40) (Fig 2-1)。TCS にお いてセンサータンパク質である Cph8 のセンサードメインを担っている Cph1 は 2 つの状態を持ち、暗闇環境で Pr 状態に、赤色光下で Pfr 状態になる(41)。Pr 状 態にある Cph8 の EnvZ キナーゼドメインはレギュレータタンパク質である OmpR をリン酸化し、リン酸化 OmpR は ompC プロモータ下流の遺伝子発現を 活性化する。赤色光の光強度を調節することによって Cph8-OmpR の出力である 遺伝子発現量を調節することは達成できているが(21)、共生系のような微生物集 団を扱うことを想定した時に光強度では微生物による吸光があり場所による影 響を受けるため、光強度は十分に強くして光照射時間で光受容微生物を制御す ることとした。その制御のために Cph8-OmpR システムの数理モデルを構築し、 モデル予測制御により目標値へ向けた最適入力を計算し、Cph8-OmpR システム の出力である遺伝子発現産物を測定そしてモデル予測へフィードバックするこ とにより単一種集団の微生物を動的に制御した。この制御システムは微生物共 生系を制御するときにも同様に役立つと考えられる。

2.2 材料と方法

2.2.1 株とプラスミド

この研究で扱った株とプラスミドを Table 2-1 に示す。大腸菌 JW3367 株(42) (National BioResource Project から入手) は大腸菌が本来保有している TCS のヒ スチジンキナーゼである *envZ* 遺伝子を欠損しており、これにより内在の EnvZ と赤色光をセンシングする Cph8(光センサーCph1 と EnvZ ヒスチジンキナーゼ のキメラタンパク質) が OmpR のリン酸化をめぐって競合する事態を防いでい る。JW3367 株は第二章の全ての実験で使われている。

この実験で必要となる 2 つのプラスミドのマップを Figure 2-2 に示す。Cph1 と EnvZ のキメラタンパク質である Cph8 は、Cph1-envZ-pPROTet プラスミド(40) (Christopher A. Voigt から入手)によって合成されている。光を吸光するのに必 要な phycocyanobilin (PCB)の合成経路は、pPCB-gfp プラスミドによって導入 している。このプラスミドによって、Cph8-OmpR システムの出力として green fluorescent protein (GFP) レポーター遺伝子も合成される。大腸菌は基本培地

(Luria-Bertani (LB) 培地中に ampicillin 50 µg/mL、kanamycin 30 µg/mL、 chloramphenicol 25 µg/mL) によって、37℃、100 rpm の振とう条件で培養した。

pPCB-gfp プラスミドは pPCB-AmpR(40) (Christopher A. Voigt から入手)を基 に作製した。我々はリン酸化 OmpR が発現を活性化させる *ompC* プロモータ下 流に GFP レポーターを挿入した。GFP レポータープラスミド (Biobrick parts: BBa_E0240) と *ompC* プロモータプラスミド (Biobrick parts: BBa_R0082) にそ れぞれ XbaI-PstI と SpeI-PstI 制限酵素を用いることによって、*ompC* プロモータ 下流に gfp 遺伝子が挿入されたプラスミドをまず作製した。そして、このプロモ ータと gfp 遺伝子は pPCB-AmpR に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) とフォ ワードプライマー (AATTCGCGGCCGCTTC) とリバースプライマー (GACTGCAGCGGCCG) と AatII 制限酵素を用いて挿入した。

2.2.2 パルス幅変更による応答実験

この章の研究では光入力のパルスを用いて Cph8-OmpR システムを組み込んだ 大腸菌を制御する。光パルス入力で制御するときのパルスの幅を決定するため の実験に関してこのセクションで述べるが、パルスを照射する周期は1 min とし ている。これは Cph8-OmpR システムが光を印加されタンパク質を生産するまで に数分かかり、それよりも短い時間で入力を切り替えられるようにと考え決定 したもので、周期が1 min であれば Cph8 状態や OmpR 状態の動特性も追うこと ができると考えている。光の照射には Figure 2-3 に示す光照射装置を用いており、 その光強度は培地表面において約 190 W/m² であり、Cph8 は 0.05 W/m² の光強度 で十分に応答するので(43)、この装置の光強度は十分であることが分かる。

パルス幅を振った光入力を周期的に細胞培地に照射し、出力である GFP 蛍光 活性の変化を測定する。Cph1-envZ-pPROTet プラスミドと pPCB-gfp プラスミド を保持している JW3367 株をオーバーナイトカルチャーし、基本培地(セクショ ン 2.2.1 にて記述) によって 50 mL 遠沈管中に 1000 倍希釈する。37℃、100rpm の振とう条件で 300 min、それぞれの光条件(1 min 周期での光照射時間 0 s、0.05 s、0.1 s、0.5 s、1 s、60 s) で培養し、590 nm での光学密度(OD590) を約 1.0 にする。次に、この培養液を 1.45 mL、0.55 mL の基本培地に注入し、同じ光条 件で OD590 が約 0.5 になるまで 30 min 培養する。最後に、1 mL のこの培養液を 1 mL の基本培地に注入し同じ光条件で 30 min 培養する。最後に大腸菌の GFP 蛍光をフローサイトメトリーによって測定する。

2.2.3 パルス周期変更による応答実験

パルス幅変更による応答実験で適していると決定した 0.1 s 幅の光パルスを、 今度は周期を変えて大腸菌に照射する。光条件を除いて培養プロセスは、セク ション 2.2.2「パルス幅変更による応答実験」で述べたものと同じである。パル ス周期は 60 s、30 s、10 s、5 s、そして恒常的な光 ON/OFF で、ずっと光 ON にしたコントロールを除いて、周期は最長で 1 min になるようにしている。

2.2.4 動的制御実験

フィードバックの有無を表しているクローズドループ制御とオープンループ 制御、どちらでもモデル予測制御を用いた。Cph8-OmpR システムが光をセンシ ングして出力としてタンパク質を生産するくらいの時間である 8 min まで未来 を数理モデルによって予測し、近似最適な入力系列を計算した。入力は 1 min ご とに切り替えることとし、0.1 s 光パルスを 1 min 中に等間隔で何回加えるかを 入力とした。最適入力を求める際に 8 min 先まで予測するので計算量が多くなる。 そ こ で 、 入 力 パ タ ー ン の 種 類 は 9 種 類 (pulses/1 min : 0、1、2、3、4、6、12、20、60) に制限することとし、あり 得ない探索域は排除しつつ計算した。

測定値のフィードバック有のクローズドループ制御では、30 min ごとのサン プル回収後、サンプル回収開始後 8 min までに GFP の蛍光活性をフローサイト メータで測定しコンピュータに値を記入する。すると、コンピュータは制御コ ントローラとしてモデル予測値と測定値の誤差をモデルに反映し、最適入力系 列の計算をやり直し、サンプル回収開始後 12 min の時点で測定値が反映された 入力が印可される。フィードバック時の、測定値からの状態推定には非線形モ デルに対応している unscented カルマンフィルタを用いた(44)。これにより、ノ イズの影響がガウス分布で出るという仮定のもとに、出力に含まれるノイズを 除去し内部状態を推定できるようになる。

動的制御実験をはじめるまでの培養はセクション 2.2.3「パルス周期変更によ る応答実験」で述べた方法で行う。動的制御実験中は 30 分ごとに培養液 1 mL を基本培地 1 mL に加え希釈すると同時にサンプリングも行う。30 分ごとの希釈 によってサンプリング時の OD590 は約 0.5 に保たれている。サンプリング後、8 min 以内にフローサイトメータによって GFP 蛍光強度を測定する。大腸菌は最 適な光入力が照射された環境で 30 分ごとに希釈されながら、実験終了まで培養 される。

2.2.5 蛍光測定

- -

すべての蛍光強度測定は Becton-Dickinson FACSCalibur フローサイトメータ (488 nm レーザーと 515–545 nm フィルター)によって行った(45)。蛍光測定値 は Milias-Argeitis らが行っているように(26)、forward scatter と中央値を用いて正 規化した。蛍光測定は 100,000 細胞の平均で行っている。

2.2.6 Cph8-OmpR システムの数理モデル

$$\frac{\mathrm{d}[P_r]}{\mathrm{d}t} = -v_1 \cdot [P_r] \cdot u + v_2 \cdot (P_{tot} - [P_r]) \tag{1}$$

$$\frac{\mathrm{d}[R_p]}{\mathrm{d}t} = v_{p1} \cdot [P_r] \cdot \left(R_{tot} - [R_p]\right) - v_{p2} \cdot \left(P_{tot} - [P_r]\right) \cdot [R_p] - \gamma \cdot [R_p]$$
(2)

$$\frac{\mathrm{d}[mRNA]}{\mathrm{d}t} = \frac{\alpha_m \cdot [R_p]^n}{[R_p]^n + K_d^n} - \gamma_m \cdot [mRNA] + leak \tag{3}$$

$$\frac{\mathrm{d}[GFP]}{\mathrm{d}t} = \alpha_G \cdot [mRNA] - \gamma \cdot [GFP] \tag{4}$$

数理モデルを用いて制御するために、我々は4つの変数;Pr状態の Cph8 の濃 度、リン酸化された OmpR(R_n)の濃度、mRNAの濃度、タンパク(GFP)の濃 度、を持つ常微分方程式でできた数理モデルを構築した。方程式(1)は Cph8 状態の遷移を、方程式(2)は Cph8 による OmpR のリン酸化を表しており、 Cph8-OmpR システムネットワーク (Figure 2-4) をベースに開発した。方程式 (3) と(4)はmRNAとタンパク質の合成と分解・希釈を表しており、たびたび遺伝 子発現のモデルとして使われる Hill 式をベースに開発した(46)。Cph8 の分子数 を細胞体積で割ることでCph8の濃度を導出している。PtotとRtotはCph8とOmpR の一定した全濃度をそれぞれ表している。Cph8の状態は反応速度 v1 と v2、そし て光入力u(値は0もしくは1で、0は光を照射しない状態)によって遷移する。 OmpR は反応速度 v_{p1} でリン酸化し、v_{p2} で脱リン酸化する。ここで我々はリン酸 化された OmpR 濃度は細胞の成長(細胞容量の増加)に依存し、速度 γ で減少 すると仮定した。R_pは GFP をコードした mRNA の合成を最大合成速度 α_mで促 進する。mRNA は R_p がない状態でもリークによって転写される(leak)。mRNA の分解速度 γm は希釈速度 γよりもずっと速いため、mRNA の希釈効果は考慮し ていない。GFP は mRNA から速度 α_G で合成される。

2.2.7 パラメータ同定のための Genetic Algorithm

方程式(1) – (4) のパラメータを同定するために、我々は simplex crossover method (SPX) (47)と minimal generation gap (MGG) (48)を組み込んだ遺伝的ア ルゴリズムを用いた。遺伝的アルゴリズムのパラメータは以下の通りである。 集団サイズ:30、世代交代数:3000、評価値はモデル値と生物実験値の二乗誤 差である。パラメータの探索範囲は Table 2-2 に示す。Igoshin らは EnvZ の自己 リン酸化、EnvZ と OmpR の結合などの反応速度を収集している(49)。本研究の モデルのパラメータは Igoshin らが報告した値を反映している(50)。

2.3 結果と考察

2.3.1 パルス幅変更による応答結果

Cph8-OmpR システムを組み込んだ大腸菌を、光強度とは違い減衰の影響を受 けにくい光パルス入力によって動的に制御する。そのためにまず、Cph8-OmpR システムのパルス応答性を調べることとした。我々は様々な光入力パルス幅 (0.01 s、0.05 s、0.1 s、0.5 s、1 s、それと恒常的な光 ON/OFF)を 60 s 周期で 印加して Cph8-OmpR システムの出力である GFP レポーターの蛍光強度を測定 した(Figure 2-5)。出力である GFP の蓄積タイムスケールは数分であるが、シ ステムの動特性を把握するためにそれよりも短いパルス周期(60s)とした。実 験結果をみると、恒常的な光入力(パルス幅 60 s)はレポーターGFP 発現を抑 制し、光入力なし(パルス幅 0 s)の出力測定値に比べ、蛍光強度が 1 / 8 に減少 していることが確認できた。パルス幅を増やすと、出力蛍光強度が減少するト レンドも確認した。このトレンドでは、パルス幅が 0.1 s と 0.5 s の間で急激に蛍 光強度が減少している。これは膜タンパク質 Cph8 が光入力に応答し、そのキナ ーゼドメインの活性が1秒以下で低下していることを示唆している。Cph1の光 誘導型の構造変化は ms のオーダーで起こるので(51)、Cph8 のもう一方のドメイ ン、EnvZキナーゼドメイン、の活性遷移はmsから1sで起こることが推測でき る。EnvZ はもともと浸透圧変化に応答し遺伝子発現を誘導するシステムのコン ポーネントだと考えると、この応答速度はとても速いことが分かる(52,53)。 光入 力を印加したときの応答は速い一方で、光 OFF にしたときの状態遷移には時間 がとてもかかることも分かった。光 OFF にすると OmpR のリン酸化、そして遺 伝子発現と下流のコンポーネントでも時間がかかる反応が多いが、Cph8のセン サードメインである Cph1 は暗条件による完全な遷移には数分かかることが報告 されており(54)、Cph8 自体の遷移も時間がかかっていることが推測される。

Cph8-OmpR システムを動的に制御するときの入力形式に関して、PWM 制御のようにパルス幅を調節することを考えたが、実験結果(Figure 2-5)でパルス幅が 0.1 s と 0.5 s の間で急激に蛍光強度が減少しているように、このシステムのパルス幅入力応答域はとても狭く、パルス幅調節でシステムを制御することは難しい。そこで、我々はパルス幅を 0.1 s に固定して、パルスを照射する周期でシステムを制御することとした。パルス幅 0.1 s を採用したのは入力応答性が高く、少ないパルス入力の印加で効率的にシステムを制御するためである。

2.3.2 Cph8-OmpR システムのモデリングとパラメータ同定

Cph8-OmpR システムを動的に制御するために、Cph8-OmpR システムにおける 反応ステップ; Cph8 状態遷移、OmpR のリン酸化と脱リン酸化、レポーター遺 伝子の発現、をモデル化した(Figure 2-4) (1) – (4) (セクション 2.2.6 の 式)。Cph8 タンパク質は恒常的に合成・分解・細胞成長に伴う希釈が行われる ので、Pr状態とPfr状態にあるCph8の総濃度は一定とした。リン酸化されたOmpR とされていない OmpR の総濃度も一定と推測されているが(55)、それぞれの状態 の OmpR は希釈・分解され、恒常的に新しく合成される OmpR はリン酸化され ていないこととした。Cph8 や OmpR と同じく、レポーター遺伝子の mRNA と タンパク質もまた変数としてモデルに組み込んだ。

この数理モデルは複数のパラメータを含んでおり、我々は生物実験データを 基に、このモデルが実験値を再現できるようなパラメータ同定を Genetic Algorithm (GA)により行った。パラメータ同定の基となる実験データであるが、 0.1 s 光パルスを照射する周期を変えた環境で大腸菌を培養し、レポータータン パク質の蛍光強度を測定した(Figure 2-6 の点)。このとき、光 ON / OFF 環境 それぞれで前培養することで、2つの初期状態を用意した。0.1 s 光パルスを照 射する周期は 60 s、30 s、10 s、5 s、それと恒常的な光 ON / OFF 条件を用意し た。周期 60 s の光パルスでは光を照射しない条件と比べわずかに GFP 蛍光活性 が下がるだけだが、周期 5 s の光パルスでは GFP の蛍光活性が光を恒常的に照 射したものと同じくらいになっていた。これらの 60-5 s のパルス周期で幅広い 出力領域をカバーできることが確認できた。

この生物実験値(Figure 2-6 の点)を用いて、数理モデルのパラメータ同定を 行った。GAを用いたパラメータ同定で、パラメータ探索の範囲は文献値(50,56) を参考に決定した(Table 2-2)。Table 2-3 に示すパラメータの同定結果を見て みると、OmpR 濃度は野生株シングルセルの測定結果と同じくらいになった(55)。 タンパク質の半減期は 38 min で、これは本実験で扱った大腸菌株の倍加時間(約 30 min)(材料と方法セクションで述べた通り、我々は 30 min 周期で濃度を半 分に希釈しており、それで菌密度はほぼ一定に保たれている)と近い値となっ ている。GFP レポータータンパク質には分解タグを付けていないので、GFP 濃 度変化は大腸菌の成長による希釈速度とGFP 合成速度の差となる。mRNAの半 減期は 30 s と同定したが、これも大腸菌のリアルタイム観測をもとに報告され た半減期 1–3 min と近い値となった(57)。これらの同定したパラメータ値セット は局所最適に陥っている可能性もあるが、ほとんどのパラメータ値は、実験に よって観測された値と近い結果となった。

2.3.3 Cph8-OmpR システムの動的制御

構築した数理モデルと同定したパラメータ値を用いて、Cph8-OmpR システム を組み込んだ大腸菌を動的制御する。数理モデルと現在の出力値(タンパク質 濃度)から最適な入力系列を計算し、出力であるタンパク質濃度を目標値へ追 従制御させる実験を行った(Fig 2-7)。測定値のフィードバックがないため実験 前にあらかじめ全入力系列を決定できるオープンループ制御と、出力を 30 分ご とに測定し目標値とのずれをモデル予測値に反映し入力系列を再計算するクロ ーズドループ制御を用いた。モデル予測制御では 8 分先の未来までモデルによ って予測し、そこから近似最適解となる入力系列を求めた。入力は1 min ごとに 切り替え、0.1 s 光パルスを1 min 中に等間に何回加えるかを入力とした。最適 入力を求める際に 8 min 先まで予測するので計算量が多くなるため、入力パター ンの種類は 9 種類 (pulses/1 min : 0、1、2、3、4、6、12、20、60) に制限し ている。

前培養を光 ON/OFF 条件でそれぞれ行い初期状態を変更して実験したが、どちらでも同様に制御できていた(Fig 2-7)。オープンループ制御では実験開始直後は出力値と目標値のずれは小さいのだが、時間が経つとその差が大きくなっていった。制御が安定した実験開始 150 分以降の測定結果を6回の制御実験分、計48の測定値と目標値の偏差を平均したところ、オープンループ制御の偏差は0.54 (SD 0.3)、クローズドループ制御の偏差は0.22 (SD 0.19)であった。これらの平均値を見る限り、フィードバックによって制御誤差が小さくなっていた。オープンループ制御含めて、この定量的な結果は構築した数理モデルと同定したパラメータ値が制御するには十分であることを示している。

2.4 まとめ

Cph8-OmpR システムを組み込んだ大腸菌をテストベットとして、光入力と測定値のフィードバックにより単一種の微生物集団の動的制御に成功した。 Cph8-OmpR システムの動特性を把握したことや、制御手法でも光パルス入力で 微生物を制御したことなど、使用できる機能や手法の多様性を広げることがで きた。動的制御実験では、オープンループ制御でも十分に制御できていたが、 フィードバックがあるクローズドループ制御ではより制御誤差を小さく制御で きていた。単一種の微生物集団の遺伝子発現量の制御で差が生じたので、共生 系の制御でもフィードバックが効果を発揮することが期待できる。共生系を制 御する際の課題として、サンプリングから測定値をフィードバックするまでに かかるタイムラグや、サンプリング周期の長さがある。しかし、我々が今回使 用したモデル予測制御とカルマンフィルタの組み合わせで、タイムラグやサン プリング周期が長くても対応できることを示せた。この制御システムは共生系 制御のための雛形としても十分期待できる。今回は微生物個体内の蛍光物質活 性を出力として用いたが、菌叢や環境中の代謝物も同じ枠組みで出力として用 いることができると考えられる。この微生物共生系の制御システムによって、 何もしないとヒトが望まない状態に遷移してしまう共生系をヒトが望む状態に 動的制御する、微生物共生系を利用するシステムの最適化に役立つ。



Figure 2-1 Cph8-OmpR システムの概念図



Figure 2-2 cph1-envZ-pprotet プラスミドと pPCB-gfp プラスミド



50mL遠沈管に2mL培養









Figure 2-5 光パルス幅変更による Cph8-OmpR システムの応答 60 s 周期で特定の光パルス幅(0.01 s、0.05 s、0.1 s、0.5 s、1 s、それと恒常的な 光 ON/OFF)を印加し(a)、Cph8-OmpR システムの出力である GFP の蛍光活 性を測定した(b)。



Figure 2-6 光パルス周期変更による Cph8-OmpR システムの応答

初期状態として光 ON (左図) と OFF (右図) で誘導培養し、0.1 s 光パルスの各 周期下(60 s、30 s、10 s、5 s、それと恒常的な光 ON/OFF) で Cph8-OmpR シ ステムの出力である GFP 蛍光活性を経時的に測定した(30 分ごとの点)。この 実験値を基にパラメータ同定した後のモデル予測値は線で表した。



Figure 2-7 オープンループ制御とクローズドループ制御による Cph8-OmpR シ ステム出力値の目標値追従制御

前培養として光 ON で培養したもの(左図)と光 OFF で培養したもの(右図) を用意することで、初期状態が異なる状況から動的制御実験をはじめた。オー プンループ制御の測定値(緑ダイヤモンド)はモデル予測値(緑線)によって、 クローズドループ制御の測定値(赤ダイヤモンド)もモデル予測値(赤線)に よって目標値(黒点線)へ向かって制御されているが、クローズドループ制御 では 30 分ごとの測定値がサンプリングの 12 分後にフィードバックされモデル 予測値にも反映されている。両制御でのパルス入力系列を下部に示している。

Strain or Plasmid	Relevant genotype and/or property
E. coli strains	
JW3367	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787, λ-, ΔenvZ738::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514
Plasmids	
cph1-envZ-pprotet	a vector synthesizing Cph8
pPCB-gfp	a vector introducing PCB biosynthetic pathway and GFP reporter for phosphorylated OmpR

Table 2-1 使用した株とプラスミド

Table 2-2 GA によるパラメータ探索域

Parameter	Lower limit	Upper limit	Unit	Description
v_1	0.1	10	s ⁻¹	Transition rate from P_{r} to P_{fr}
<i>v</i> ₂	0.00001	0.1	s ⁻¹	Transition rate from P_{fr} to P_{r}
P _{tot}	0.005	1	μΜ	Cph8 concentration The number of Cph8 is divided by cell volume 1 μm^3
v_{p1}	0.0001	1	$s^{-1}\mu M^{-1}$	OmpR phosphorylation rate by Cph8
v _{p2}	0.0001	1	$s^{-1}\mu M^{-1}$	OmpR dephosphorylation rate by Cph8
γ	0.0002	0.001	s ⁻¹	Dilution rate upon growth
R _{tot}	0.5	5	μΜ	OmpR concentration
α_m	0.001	0.1	s ⁻¹	mRNA synthesis rate
n	1	10		Hill coefficient
K _d	0.01	2	μM^{-1}	Dissociation constant
Υm	0.001	0.05	s ⁻¹	mRNA degradation rate
leak	0.00001	0.05	s ⁻¹	Leak of mRNA synthesis
α_G	0.0002	0.05	s ⁻¹	Protein synthesis rate

Parameter	Value
<i>v</i> ₁	$0.499883[s^{-1}]$
<i>v</i> ₂	$0.000905[s^{-1}]$
P _{tot}	0.125480[µM]
v_{p1}	$0.134366[s^{-1}\mu M^{-1}]$
v _{p2}	$0.036881[s^{-1}\mu M^{-1}]$
γ	$0.000305[s^{-1}]$
R _{tot}	0.082036[µM]
α_m	$0.015811[s^{-1}]$
n	2.541060
K _d	$0.05827[\mu M^{-1}]$
Υm	$0.030053[s^{-1}]$
α_G	$0.004921[s^{-1}]$
leak	$0.000764[s^{-1}]$

Table 2-3 パラメータ同定結果

第三章:

天然の微生物多種共生系の入力応答の計測

3.1 導入

この章では、「天然の微生物多種共生系の入力応答の計測」を行う。光によって特定の微生物を活性化し、その微生物が他の微生物にどれほど影響を及ぼすことができるか、制御工学の言葉でいえば「可制御性」を評価することとなる。この章で天然の多種共生系を用いる理由は、多種共生系を扱うためである。 微生物生態系では"The Great Plate Count Anomaly"という問題がある。天然環境からサンプリングし顕微鏡で観察すると多種多様な微生物がいるのにプレート上で培養するとほとんどの微生物が姿を消しているということを表している。現在1%のバクテリアしか培養できていないとも言われているが、Pande と Kost はその主な理由を3 つ挙げている; (i)存在量がとても少ないバクテリアは多いので、上手くサンプリングできていない、(ii) 非生物的な条件(温度、pH、湿度など)が適切でない、(iii)生物的な相互作用が生存に影響を与えている(58)。 我々はこの(iii)生物的相互作用に着目していることになる。

我々は天然の微生物多種共生系として、安定した微生物共生系のサンプリン グのために微生物マットを扱うこととした。光合成微生物マットは多層バイオ フィルムで、光合成細菌と化学合成細菌から成り、日光が届き乱されない環境; 温泉、浅い海底、塩湖などにできる(59)。温泉微生物マットは高温なため純粋な 微生物生態系であり、世界中で見かけることができる(60,61)。特に本研究で扱う 中房温泉の微生物マットは多様な光合成細菌が化学合成細菌と共存しており研 究されてきた(60,62-65)。

光合成細菌は微生物マット中で微生物コミュニティを形成し、化学合成バク テリアに様々な方法(一次生産者、好気環境の生産者、硫化水素の消費者とし てなど)で影響を与えている(Fig 3-1)。例えば、独立栄養細菌のシアノバクテ リアは酸素、有機物、ビタミンを光合成によって生産し、環境中に放出し好気 従属栄養細菌が消費している(66-69)。*Chloroflexus* spp.のような糸状の酸素非発 生型光合成細菌のいくつかは硫化水素を元素状硫黄に酸化することで自然界の 硫黄サイクルで重要な役割を果たしている(63,65,70,71)。微生物マットのトラン スクリプトーム解析やメタボローム解析の結果から、有機物、酸素、窒素を光 独立栄養細菌と光従属栄養細菌間でやり取りしていることも確認されている (72-74)。これらの実験結果は光に依存した光合成細菌と化学合成細菌との関係 を支持している。

多様な光合成細菌の持つ異なる吸光波長を基に、我々は特定の光波長を照射 することにより対応する光合成細菌が活性化し、次いで他のコミュニティメン バーにも影響を与えると我々は仮定した。中房温泉では酸素発生型光合成細菌 であるシアノバクテリア(Thermosynechococcus 属)が48-62℃の微生物マット 表層に生息する(64)(K. Matsuura and S. Hanada, unpublished results)。一方で、 光合成細菌 Chloroflexi 門(Chloroflexus 属と Roseiflexus 属) はシアノバクテリア の層の下に出現する(60,64,75)。これらの光合成細菌はそれぞれ異なる光波長を 利用しており、シアノバクテリアは主に 625 nm と 680 nm の波長をフィコビリ ンとクロロフィル (Chl) a をそれぞれ用いて吸光し(76)、Chloroflexus は主に 740 nm 波長をバクテリオクロロフィル (BChl) cを用いて(77,78)、 Roseiflexus は主 に 880 nm 波長を BChl a を用いて吸光する(79.80)。 シアノバクテリアの光合成は 有機物と酸素を周囲の環境中に提供する(66-69)。Chloroflexus spp.は 3-ヒドロキ シプロピオン酸回路を介して光独立栄養的に成長し有機物を周辺の従属栄養細 菌に循環していることが報告されている(77,81–83)。Roseiflexus castenholzii は光 独立栄養的に成長することは示されていないが、3-ヒドロキシプロピオン酸回路 に必要な全遺伝子セットを持っており、独立栄養的もしくは混合栄養的に無機 炭素を固定するのではないかと推測されている(84,85)。さらに、イエローストー ンの温泉水から単離された Roseiflexus sp. RS-1 は in situ で光独立栄養的もしくは 光混合栄養的に成長することが炭素安定同位体とメタトランスクリプトーム解 析から示されている(72,84,86)。この証拠を基に、*Thermosynechococcus*、 Chloroflexus、Roseiflexus が利用する光波長を個別に照射することで対応する光 合成細菌が増殖し、共生している化学合成細菌も同様に影響を受けると仮定し た。本章の実験では天然の微生物マットコミュニティをコントロールされた異 なる光条件で in situ で培養し、16S rRNA 遺伝子配列を用いて解析した。この手 法により特定の光合成細菌をマスター菌としてどれだけ他の菌を制御できるの かという評価ができる。

3.2 材料と方法

3.2.1 微生物マットの採取場所と採取方法

世界で最も研究されている温泉の一つである中房温泉は北アルプス(日本、 長野県)に位置し、標高は約1,400 m である。源泉の最高温度は90℃で硫化物 を豊富に含み、地表を流れる温泉の温度勾配が糸状バイオフィルム、酸素非発 生型光合成微生物マット、酸素発生型光合成微生物マットなど様々なコミュニ ティの生息を可能としている。中房温泉には2つの特徴的な場所がある。1つ は温泉水がコンクリートの壁を流れおちる場所で、色とりどりの微生物コミュ ニティが発展している(Wall site; 36°23'20''N、137°44'53''E; Fig 3-2A)。もう 1つは Wall site から上流に 300 m離れたところにある場所で、温泉水が砂地の 地表にできた水路を、流入出がある小さなプールを作りながら流れている(Site B; 36°23'33''N、137°44'53''E; Fig 3-2B)。Wall site の噴出口の化学・ガス成分 は、亜硝酸塩、硝酸塩、そして O₂が測定限界以下であることが報告されている

(窒素化合物 <0.01 mg/L) (87)。硫化物の濃度は Site B で約 120 μM であり、 Wall site と似ている(88) (A. Nishihara、K. Matsuura; unpublished results)。温泉 水は弱アルカリ性で硫化物濃度が豊富であり、そのため硫黄サイクルに関わる 微生物コミュニティが研究されてきた(63,65,89)。63°C 以下のマットではシアノ バクテリアとクロロフレクサス門に属する酸素非発生型光合成細菌が優勢で (63,65)、この特徴は日本の他の温泉やイエローストーンのアルカリ性温泉でも見 られる(60,90)。

我々は 2016 年 5 月 30 日に Wall site にある微生物マットから 40 cm³ (10×4× 1 cm³)を採取した (Fig 3-3)。温度は 56°C、pH は 8.7 であり、FUSO-370 RTD Thermometer (FUSO、Tokyo、Japan)と PH-6600 (Custom Corporation、Tokyo、 Japan)をそれぞれ使い計測した。採取したサンプルは 50 mL チューブ中で手動 攪拌し、3 台の光照射装置のくぼみに約 1.6 cm³ (2×1.6×0.5 cm³) ずつ分注し、 透明のアクリル板で上部をカバーした (Fig 3-4)。分注した後に残った約 15 cm³ の 50 mL チューブ中にある微生物マットは 2 mL チューブに分注し、後に DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子解析を行った。Wall site では壁上に温泉水が流れている ので装置は設置できず、装置は Site B の水平な温泉水が流れる水路に設置した。 装置設置場所の設置期間中の平均温度と pH はそれぞれ 56–50°C と 7.3 であった

(Fig 3-5)。20日間の光照射の後、クリアカバーの表面にできたバイオフィル ムと共に微生物マットはオートクレーブによる滅菌済みのピンセットを用いて 回収した。微生物マットに加えて、装置1付近の温泉水を0、7、14、20日目に 1 L ずつ採取し、16S rRNA 遺伝子解析により経時観察した。微生物マットに関 しては装置に仕掛けられる微生物マット容量の制約から経時観察はしていない。 全ての測定は装置3台分行った(装置1-3)。3台の配置は温泉水の流れに沿っ て異なるため、装置それぞれの周辺温度は少し異なっている(装置 1-3 はそれ ぞれ 55°C、53°C、51°C; Fig 3-5)。

3.2.2 光照射

微生物マットは我々が開発した光照射装置を用いて、特定の光波長が照射される。この装置は黒色アクリル板(Shinkolite、Mitsubishi Rayon Co.、Ltd.、Tokyo、

Japan) でできており、5つの通路(暗闇、625 nm 波長光、730 nm 波長光、890 nm 波長光、3 波長合成光) でできている(Fig 3-6)。攪拌された微生物マットはこ のくぼみに設置し、温泉水が微生物マットと触れ合えるように上部に少し空間 が空いた状態で透明のカバーをしている。マットは20日間、連続的に特定の光 波長(5 mA; 625 nm 波長光用に OSR5CA5B61P、730 nm 波長光用に SX534IR-730、 890 nm 波長光用に TSHF5410; 全て Akizuki Denshi Tsusho Co Ltd.、Tokyo、 Japan から入手)が照射される。培養時間である 20 日間は、3 種の光合成細菌の倍加 時間が約24時間であることをベースに決めた(81,86,91)。さらに、Figure 3-7 に 示したように、初期マットを採取した場所は 20 日間で部分的な微生物マットの 回復が観察されている。そのため、この時間枠は光条件間での違いを観察する には十分であることが予期される。LEDから微生物マットの表面までは 20 mm である。測定距離の制限で spectroradiometer (OL-750、Gooch & Housego、Ilminster、 UK) ではこの距離での光強度を測定できないため、30 cm と 50 cm で光強度を 測定し (Fig 3-8)、逆二乗則によって 20 mm の距離での光強度を計算した。625、 730、890 nm 波長光での 20 mm 距離の光強度はそれぞれ約 0.2、0.4、0.1 W/m²/nm であった。それぞれの LED の波長幅が±30 nm ほどあり、BChl c の in situ での吸 光域とかぶるのを避けるため、Thermosynechococcus spp.を活性化させる光波長 は 680 nm ではなく 625 nm を用いた (Fig 3-8)。

3.2.3 DNA 抽出と PCR 増幅、そしてシーケンシング

ゲノム DNA は微生物マットと温泉水から PowerBiofilm DNAisolation kit と PowerWater Sterivex DNA isolation kit (共に Mo Bio Laboratories、Carlsbad、CA、 USA) をそれぞれ用いて行った。16S rRNA 遺伝子の V3、V4 可変領域を KOD FX Neo polymerase (Toyobo、Osaka、Japan) をプロトコル通りに使用して増幅した (プライマー情報は Table 3-1)。 PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega、Madison、WI、USA) を用いて精製した。精製したサンプル は MiSeq (Illumina、San Diego、CA、USA) で、dual index reads と 300-bp read length の設定で配列を読んだ。

3.2.4 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた種情報の割り当て

partial 16S rRNA 遺伝子のペアエンドリードは 97% 配列相同性でクラスターし、 SILVA データーベースを用いて分類した(92)。データ処理と種情報の割り当ては 以下の手順で行った。(i) PRINSEQ(93)により閾値スコア 20 で 3'エンドから配 列のトリミングを行う; (ii) Bowtie2(94)により PhiX ゲノムのリードを除去す る; (iii) cutadapt(95)により 20%エラー許容でプライマー配列をトリミングす る; (iv) QIIME(96)によりペアエンドリードを結合する; (v) usearch(97)によ り総期待エラー1 でクオリティフィルタリングする; (vi) usearch により 100% 相同性を持つリードをまとめる; (vii) usearch によりシングルトンとキメラ配 列を除去する; (viii) uclust により 97%相同性で OTU (operational taxonomic unit) にまとめる; (ix) uclust と QIIME の 97%配列相同性用 SILVA 分類データ (SILVA 123 QIIME compatible database、taxonomy 7 levels、最終修正 2016 年 5 月)により、 種情報を割り当てる。処理前後の配列数を Table 3-2 に示す。配列数に関わる *p* 値は、培養マット内での比較では対応のある両側 *t* 検定を、培養マット・初期マ ット・温泉水サンプル間での比較ではウェルチの検定により計算している。

相対量の変化はそれぞれの OTU を観察して解析している。ここでは OTU の 選択の仕方について述べる。我々は実験環境において明らかな反応を示したメ ンバーとサンプル内で相対量が大きかったメンバーを考察した。これには、相 対量が大きいメンバーはその生態系において重要であろうという仮定が根底に ある。ある光条件下での相対量(3台の平均)が1%以上のOTU 配列と、それぞ れの条件で特異的な反応を示した OTU 配列に対して解析を行った。1%の閾値は ある程度任意で、過去の研究をベースに決めた(98)。さらに、光合成細菌の可能 性があるものや、相対量が大きく変化した OTU 配列(基準はセクション 3.3.6 「光が影響を与える特定の微生物」で述べる)は、支配的なバクテリアだけに しばられないように、解析を進めた。これらの配列は NCBI nr/nt データベース にある既存のものと BLAST サーチ(99)によって比較し、ARB software package(100)を用いて系統樹解析を行った。配列は pt_server データベースを用い て自動アライメントし、二次構造情報をベースに手動で正した。初期の系統関 係性はアライメントされた配列を SILVA の tree SSURefNR99 1200 slv 123 tree backbone (SSU Ref. NR 123、2015 年 7 月 リリース) に加えることで作製した。 ARB package に含まれる phyML software を使って maximum likelihood method を 基に、系統樹を作製した。inferred confidence は 100 bootstrap replicates をベース とし、値が>50のもののみを系統樹に表示した。長さが≥1,000 ntの配列のみ系統 計算に用いた。本研究や以前の研究の短いアンプリコン配列(<1000 nt)は、未 培養の partial 配列も同様だが、系統樹のトポロジーを変えない ARB parsimony method を用いて加えた。

3.2.5 微生物多様性の解析

バクテリア多様性は 97% 相同性配列を基に計算した Shannon Diversity Index、

Chao1、observed OTUs、そして euitability を用いて評価した。これらの値と rarefaction curves は QIIME(96)を用いて計算し、深さは 90,000、試行回数は 10 と した。この値に関する p 値は、培養マット内での比較では対応のある両側 t 検定 を、培養マット・初期マット・温泉水サンプル間での比較ではウェルチの検定 により計算している。さらに、光波長がもたらすメンバーの相対量変化は、暗 闇環境をコントロールとした、異なるそれぞれの光条件下での各 OTU の相対量 (Fold change)を計算することによって決定される.

Fold change : $F_{i,i,k} = R_{i,i,k}/R_{i,0,k}$

Fold change は光条件下のサンプルの相対量 (R_{i,j,k})を暗闇環境の相対量 (R_{i,0,k}) で割ったもので、i、j、k はそれぞれ OTU ID、光条件 (0:dark、1:625 nm、2:730 nm、3:890 nm、4:3 波長混合光)、装置 ID (1–3) を示している。Fold change による解析はリード数が 10 以上のものに制限しており、これはリード数が少な いと相対量が変わりやすくデータの信頼性低下を防ぐためである。

3.3 結果と考察

3.3.1 微生物マットの in situ 培養後の変化

本研究では、異なる光合成細菌が微生物マット中の微生物多様性や構成に与 える影響を調べるために、環境を操作する手法を用いた。温泉水中の光合成微 生物マットを採取し、撹拌した後、3種の主要な光合成細菌;Thermosynechococcus、 Chloroflexus、Roseiflexus を個別に活性化させるために特定の光波長下でマット を培養した。3 つの光波長(625 nm、730 nm 、890 nm)を用いて光合成細菌を 刺激した。暗闇と 3 波長混合光はコントロールとなっている。マットは in situ の天然の温泉水中で、連続的な LED 光で培養した(Fig 3-9)。培養 20 日後、マ ットを回収し、微生物コミュニティを 16S rRNA 遺伝子アンプリコン配列解析し た。培養後マットで主要なメンバー(相対量 >1%)、3 種の光合成細菌、温泉 水で支配的な Sulfurihydrogenibium sp. (OTU3, 99% nt identity)を Figure 3-10、Table 3-3 と 3-4 に示す。さらに、それらを BLAST による相同性サーチにかけ、系統 樹解析も行った(Fig 3-11)。3 種の光合成細菌; Thermosynechococcus sp.、 Chloroflexus aggregans、Roseiflexus castenholzii は対応する光条件で増加したが、 詳細に関してはセクション 3.3.6.1 「光合成細菌への光波長の影響」で考察する。 まずは、16SrRNA解析結果とともに、光条件による微生物マットの見た目の変 化について考察する。

異なる光条件下での20日間の培養によって、微生物マットは色に関する見た 目の変化が観察された(Fig 3-9)。625 nm 波長光では薄い緑の層が形成され、 16S rRNA 遺伝子の情報(Table 3-3) も含めて、これは Thermosynechococcus sp. に起因することが推測される。この層は 1 mm 以下の薄さで、装置周辺の砂底に太陽光を浴びて新しく形成された緑色のマットに似ている。730 nm 波長光で培養された微生物マットは、マット上部に Chloroflexus sp.が主要であると推測される約 3 mm の茶色の層が、下部に約 2 mm の Roseiflexus sp.に起因するオレンジーピンクの層が形成された(Fig 3-12)。この分布は、FISH 解析によってアルカリ性マット中で Roseiflexus が集中する層のすぐ上部に Chloroflexus の層が形成された報告と一致する(101)。890 nm 波長光と暗闇条件では微生物マットに色の違いは見られなかった。両方オレンジーピンクで、この色は Roseiflexus が支配的なコミュニティに関連する(60,64)。Roseiflexus は光混合栄養/従属栄養でも化学従属栄養でも生育できるのでこれは予期した結果であり(79)、Roseiflexus castenholzii OTU2 が両条件で主要であった(17%±4% SD vs 11%±1% SD)。

注目すべきは、光条件でマットの固まり具合も異なっていたことである。730 nm 波長光、890 nm 波長光、3 波長混合光条件では微生物マットがまとまり固く なっていた。一方で暗闇や 625 nm 波長光条件で成長した微生物マットはルーズ でまとまりがなかった。シアノバクテリアはバイオフィルムやマットを構築す る要素である細胞外高分子(EPS)を合成する能力がある(102)。中房温泉の微生 物マットから単離された Thermosynechococcus sp. NK55 はこの EPS を単培養では 作らず、栄養豊富な環境での共培養で合成する(S. Haruta、K. Matsuura; unpublished results)。これは Chloroflexus sp.や Roseiflexus sp.が 730 nm、890 nm 波長光条件で直接的/間接的にマット形成に応じていることを示しているのか もしれない。セルロース合成に関わる cesA/celA/bcsA 遺伝子を保有しているので、 Chloroflexus、Roseiflexus spp.はバイオフィルムの要素であるセルロース(103)を合 成できる可能性がある(104)。まとまりのある微生物マットにはセルロースが存 在するという仮説は、セルロース分解菌だと推定されている OTU 配列が増加し ていることからもサポートされている。730 nm や 890 nm 波長光条件で SJA-28 メンバーOTU41 (Chlorobi) と Ruminiclostridium sp. OTU30 (Firmicutes) が増加 していた(Table 3-5)。嫌気メタン環境でセルロースが存在するときに SJA-28 グループは増加することが実験的に報告されており、セルロース分解の機能が 推測されている(105)。Ruminiclostridium spp.においてはその機能がすでに示され ている(106)。

異なる光波長条件の影響は、微生物マットの色と固まりによって観察された。 さらに、予想していた通り、光条件によってバクテリアの構成と相対比率が異 なっていた(Fig 3-10)。これに関してはセクション 3.3.6.1「光合成細菌への光 波長の影響」で述べる。

3.3.2 培養後の微生物マット、初期マット、温泉水でのバクテリア

多様性

光条件での 20 日間の培養や初期マット、温泉水での相対的な多様性は、16S rRNA 遺伝子解析された(Fig 3-10)。微生物マットと温泉水、計 22 のサンプル が解析された。微生物マットは 5 つの異なる光条件で 3 台分、装置に設置した 初期マットの残りを 3 サンプル、温泉水に関しては経時サンプル (0、7、14、20 日目)を解析した。全 22 サンプルで、それぞれ 129,173±18,479 SD の処理さ れた配列が解析に使われた。光条件の違いや装置(温度)の違いで、この処理 済み配列数に有意な差はほぼ全てのサンプル間でなかった (ps > 0.14)。しかし、暗闇条件は 625 nm 波長光条件や 3 波長混合光条件と有意な差が生じた($ps \sim 0.07$ 、 ~0.03)。この配列の数は、暗闇条件で 143,096±9024、625 nm 波長光条件で 113107±16739、3 波長混合条件で 126,066±5680 であった。しかし、多様性の rarefaction curves を見てみると、10,000 以上の配列数ではほぼ平坦域に達してお り、配列数は多様性にとって問題ないことが示されている(Fig 3-13–16)。

コミュニティの多様性は OTU 配列の Shannon Diversity Index、Chao1、OTU richness、equitability やコミュニティメンバーの相対量を用いて評価した(Table 3-6)。 平均で 380±75 の数の OTU がそれぞれのサンプルで検出され、この検出 された OTU 数は期待される OTU 数 (Chao1) の 90±6% で良くカバーしていた。 温泉水サンプルの Chao1 richness はマットサンプルのものよりも大きかった (577±95 vs 391±30 respectively) (p < 0.05)。温泉水サンプルの大きな OTU 数や Chao1 richness に比べ、多様性指数と equitability は小さかった (Shannon Diversity Index: 2.9±0.4 vs. 5.1±0.3、equitability: 0.32±0.05 vs. 0.60±0.03;温泉水 vs マット)。

マットコミュニティメンバーは温泉水のコミュニティメンバーと全く異なっ ていたが、培養前後の微生物マットでも生物多様性が大きく異なっている(Fig 3-10)。Shannon Diversity Index と equitability は培養後マットで増えているし (*ps* <0.05)、コミュニティメンバーの構成と相対量が変わったことが観察されてい る(Table 3-3、3-6)。初期マットで主要な(≥1% 相対量)16のOTUメンバー の内、3波長混合光条件で8つのOTUは減少し、3つのOTUだけが増加した(Table 3-7)。好気や微好気の光合成細菌(*Thermosynechococcus* sp. OTU7, *Chloracidobacterium* sp. OTU26, *Elioraea* sp. OTU34)の相対量は初期マットから 減少した(それぞれ 6.3%、3.9%、1.7%が 0.3%、0.0%、0.2%に減少した)。*Elioraea tepidiphila* は化学従属栄養細菌と報告されているが(107)、*Elioraea* sp.は光合成を すると推測されており、詳細はセクション 3.3.6.1「光合成細菌への光波長の影 響」で述べる。 培養後の嫌気と好気バクテリアの変化は、培養後のマットでの酸素濃度が低下したことを示しており、これは酸素発生型光合成細菌 Thermosynechococcus が活性化された条件下でも同様であった(Table 3-7)。これは初期マットを撹拌したことと、人工光の光強度が天然のものと比較して弱かったことが理由として考えらえる。弱い光はシアノバクテリアの光合成活動を減少させ、一方で攪拌は豊富なバイオマスの分解時に使う酸素消費量を増大させた可能性がある。人工光の光強度は快晴日の日光の20%ほどで、くもりの日程度である(108)。そのため、人工光で培養したマットでは光合成活動とその結果としての酸素産出が、太陽光が良く当たり栄養や空気も温泉水から得られる初期マットよりも低下したことが考えられる。さらに、連続した光照射と限られた光波長という人工環境が自然環境とは異なり、光合成細菌の減少につながったのかもしれない。天然環境では光強度や酸素濃度が1日周期で変動していることが温泉中の光合成マットのメタトランスクリプトーム解析で示されている(72,109,110)。

3.3.3 培養マットでのばらつきと温度の影響

3 台の装置に設置したサンプル間で、コミュニティメンバーの相対量や多様性 の変化が観察された。我々はマット内の自然のばらつきの影響を抑えるために3 台の装置を用いるアプローチをとった。しかし、自然の温泉環境では3 台の装 置周辺で温度を統一することはできなかった(Fig 3-9)。温度という2つ目の独 立変数を加えないために、温度の変化による影響を分析した。装置1(55°C)で は装置3(51°C)と比べ、OTU richnessと Chao1が小さかったことが分かった(p ~0.02、p~0.07) (OTU richness: 345±10 vs. 379±11、Chao1: 383±20 vs 419±16)

(Table 3-6)。これは、温度が高いと種の豊富さが失われることを示唆しており、 中房温泉での T-RFLP 法(terminal restriction fragment length polymorphism)とク ローンライブラリー法によっても報告されている(75)。しかし、装置1と2の間 と、2と3の間では検査した全ての指標に関して有意な差はでなかった(Table 3-6)。この結果は我々の実験環境での温度勾配は、コミュニティの多様性にそ の勾配に則って徐々に影響を及ぼしていることを示唆している。

それぞれの OTU 相対量の 3 台の装置内での変化は Figure 3-10 と Table 3-3 に 示されている。Figure 3-10 にリストされている主要なメンバーの 3 台の装置間 での変動係数 (CV) は 0.01 から 1.52 の幅がある (各光条件の平均でみれば 0.15– 0.82) (Table 3-4)。このばらつきの一部は自然に発生したものであるが、もう 一方で、コミュニティメンバーの温度適応の寄与も考えられる。全ての光条件 で大きなばらつき (CV >0.5) を示す OTU は温度の影響を強く受けていること を示唆していて、例えば Hydrogenedentes OTU4 と OTU21、*Fervidobacterium* sp. OTU12、"Ca. Chloranaerofilum sp." OTU27、Ruminiclostridium sp. OTU30 がいた (Fig 3-10、Table 3-5)。特に Hydrogenedentes OTU4 は装置 3(51°C)で相対量を大き くするという明らかなトレンドを見せ、本実験環境の中での低い温度を好むこ とをうかがわせる。この OTU 配列は Hillside Springs の 45-53℃ での微生物マッ トで検出された未培養のバクテリアと高い相同性(99% nt identity)を持ってい る(111)。Hydrogenedentes OTU21 (89% nt identity with OTU4) は反対に、装置1 (55°C)で相対量を大きくし、OTU4とは最適温度が異なっている可能性を示し た。OTU12 も装置1の比較的高温での増加傾向を示し、65℃ が最適温度である Ferividobacterium riparium (98% nt identity) と単離株の中では最も高い相同性を 示していた(112)。面白いことに、"Ca. Chloranaerofilum sp." OTU27 と Ruminiclostridium sp. OTU30 は1つのサンプルのみでとても大きく増殖しており (Table 3-5)、光と温度両方の影響をうかがわせる(OTU27に関してはセクシ ョン 3.3.6.1 「光合成細菌への光波長の影響」で考察している)。その他のメン バーは特定の条件で高いばらつきを示すのみであった。特に光合成細菌は光条 件によって異なっていた。例えば Thermosynechococcus sp. OTU7 は暗闇条件で大 きなばらつきを示したが(0.67)、活性化される 625 nm 波長光条件や3波長混 合条件では小さかった(それぞれ 0.23、0.22)。Chloroflexus sp. OTU10 も同様で、 730 nm 波長光条件と 3 波長混合条件で暗闇条件よりもばらつきが小さかった

(0.29、0.14 vs. 0.41)。これらのケースでは、活性化される光条件で相対量のば らつきが小さかったことは、活性状態であれば競争に強く、暗闇条件では受け 身になり他のより活性状態のバクテリアの影響を強く受けていることを示して いるのかもしれない。*Roseiflexus* sp. OTU2 はこのトレンドには乗っておらず、 暗闇条件で低いバラつきであった(0.06)。これは *Roseiflexus* sp.が暗闇環境で も化学従属栄養的にも生育できる特性ゆえかもしれない(79)。3 台の装置間での ばらつきは温度勾配に寄与するところが大きいが、温度の影響を直接的・間接 的に受ける者は特定のメンバーで、さらに温度が高まると種の豊富さが下がる ことを示唆した。

3.3.4 暗闇条件での微生物マットコミュニティ

暗闇条件で培養したマットの Shannon diversity は光条件で培養したマットと 有意な差はなかった(ps > 0.24) (Table 3-6)。培養条件によってそれぞれ OTU の相対量は変化したが、暗闇条件での主要なメンバー($\geq 1\%$ 相対量)は他の全ての 光条件の主要なメンバーと一致していた。ただし、*Chloroflexus aggregans* を表す OTU10 は例外で、暗闇条件では相対量が 3 波長混合条件と比較してとても小さ くなっていた($0.3\pm0.1\%$ vs. $3.1\pm0.4\%$)。この暗闇条件での大きな減少は、化学 合成的成長のためには酸素が必要なため、本実験環境では光合成生活を好むこ とを反映している。Chloroflexusの基準株では暗闇環境での化学合成成長は好気 条件でしか観察されておらず(78)、暗闇環境で予想される嫌気条件では Chloroflexusの成長が阻害されることを示唆している。興味深いことに、暗闇環 境で主要なメンバーは全て従属栄養細菌で、第一次生産者としての化学独立栄 養細菌は見られなかった。しかしながら、化学独立栄養細菌と関係する OTU は あり、例えば Thiobacter sp. (OTU46、0.8±0.1%) や Caldimicrobium sp. (OTU45、 0.13±0.01%) がいて、比較的相対量が大きな (≤1%かつ≥0.1%) メンバーである。 これらの結果は微生物マットの多様性が、独立栄養細菌による第一次生産物と いうよりも初期マットに含まれるバイオマスと栄養によって支えられているこ とを示唆している。しかしながら、培養実験で示されてはいないが、OTU9(暗 闇条件で4±1%) に関係している Thermodesulfovibrio sp.は化学合成的に成長でき る可能性が還元的アセチル-CoA 経路の酵素遺伝子群の存在から示唆されており (113)、暗闇嫌気環境でのマットの第一次生産者として貢献している可能性があ る。

3.3.5 光波長が微生物マットの多様性に与える影響

光条件間で種の豊富さや多様性に有意な差は見られなかったが、暗闇条件と 比較しての光波長の影響は相対量の変化として表れており、それを Figure 3-17 に片側対数のヒストグラムとして示す。625 nm、730 nm、890 nm、3波長混合 光マットでの Fold change ヒストグラムの平均中央値はそれぞれ 1.15、0.90、0.98、 0.98 であった。625 nm 波長光マットの Fold change の平均中央値が 1.15 という ことに関して、62%の OTU の相対量が暗闇条件のときに比べ増加していた。一 方で、Fold change の平均中央値が 1.0 以下ということは半分以上の OTU がその 光波長によって相対量を減らしているということである(少数の OTU はその分 多めに増加することになる)。890 nm 光波長マットで見られるブロードしたヒ ストグラムは相対量が如実に変わった OTU が多いことを示しており、増加と減 少した OTU の数が同等であることが中央値が約1 であることから分かる。これ らの違いは、それぞれの光波長条件で最も量が多い光合成細菌(625 nm 波長光での *Roseiflexus*)に関係している可能性が高い。

625 nm 波長光条件での 62% の OTU の 増加というのは 初期 マットコミュニティ が *Thermosynechococcus* と共に生息することに適していたこと、そして暗闇条件 での 生息を苦手としていたことを示唆している。シアノバクテリアは光合成を 通して酸素を生産し、ビタミンや有機物を提供し、微生物生態系の他の種に重
要な影響を与えている(68,69)。730 nm 波長光条件では平均中央値が1以下で減 少した OTU の方が多いことは、その光条件下で *Chloroflexu* が他のコミュニティ メンバーにとって有益ではないこと、そしてそれは競争のせいかもしれないこ とを示唆している。OTU10 と 99%配列相同性を持つ *Chloroflexus aggregans* は 様々な種類の有機物を嫌気光条件で消費することが報告されており(78)、多くの 従属栄養細菌の減少はこのバクテリアが栄養を枯渇させている可能性を示唆し ている。

890 nm 波長光条件での Roseiflexus の増加は正と負、両方の影響を微生物コミ ユニティに対して持っていることが、ヒストグラムがブロードであること、そ して平均中央値が約1であることが示唆している。OTU2 が相同性を持つ Roseiflexus castenholzii は独立栄養的もしくは混合栄養的に無機物を利用した成 長をすると考えられ、周囲のバクテリアが利用できる有機物や栄養の第一次生 産者として働いている可能性がある。さらに、この種はゲノム情報から硫黄サ イクルに関わっていることが示唆されており(86)、他の硫黄サイクルに関わる微 生物の成長を促進したり、電子ドナーの奪い合いで阻害したりしている可能性 がある。

3.3.6 光が影響を与える特定の微生物

以下のセクションでは光条件の違いが個別の微生物に与えた影響を考察する。 もともとのばらつきに加え3台の装置間では温度の違いがあるため、3台の平 均値は信頼度が限られている。そこで我々は、3台のうち少なくとも2台で光 波長に対して強い影響を受けたメンバー(暗闇条件をベースとした Fold change が<0.5 もしくは>1.5)を扱った。全16のOTUメンバーを Table 3-5 に示し、考 察する。

3.3.6.1 光合成細菌への光波長の影響

本実験で最も豊富に存在した光合成細菌は Roseiflexus、Chloroflexus、 Thermosynechococcus で、890 nm、730 nm、625 nm 波長光条件でそれぞれ支配的 であった(Table 3-3)。Thermosynechococcus sp.は3 波長混合条件で最も増えた が、Chloroflexus と Roseiflexus spp.ではその通りではなかった。これは、 Chloroflexus と Roseiflexus の間で電子ドナーをめぐる競争が増えたためとも、 Thermosynechococcus が作り出す高濃度の酸素が両光合成細菌の成長を阻害した ためとも考えられる。両光合成細菌は嫌気環境でのみ光栄養的に成長できると 知られている(78,79)。さらに、Chloroflexus と Roseiflexus はマットのほとんど同 じ深さで見つかっており(101)、これは彼らが共通の資源を利用していることを 示唆している。3 波長混合条件では、両光合成細菌は活性化され、そのため共通 の資源をめぐって競争しているのであろう。

全てのシアノバクテリアと同じく、*Thermosynechococcus* spp.はクロロフィル *a* (*A_{max}* = 680 nm) とフィコビリン (集光性色素フィコビリソーム中のアロフィコシアニン; *A_{max}* = 625 nm) を色素として合成し、酸素発生型の光合成を行っている(76)。初期マットに比べ全ての培養マットでその相対量は減じているが、光波長下では暗闇条件に比べ相対量は増大している。in vivo 実験でのシアノバクテリアの吸光度の通り、625 nm 波長光と3 波長混合光で相対量は 16 倍と 22 倍と最も増大した。この影響は見た目にも現れており、1 mm の緑色の層がマット表面とカバーの両サイドに現れた。さらに、730 nm と 890 nm でもこれらの波長の一部を吸光してか増大したが、見た目の変化に現れるほどではなかった。

BChl c とクロロゾームを含む糸状酸素非発生型光合成細菌である Chloroflexus aggregans は 730 nm 波長光と 3 波長混合光で特に増加し、この微生物の BChl c の A_{max} 740 nm と良く一致した(78)。BChl a は BChl c に比べるととても低量で(78)、 BChl a (890 nm)の吸光の影響は C. aggregans に関連するシーケンスの増加に全 く現れなかった。

クロロゾームを欠損し BChl a を主な感光色素として発現している Roseiflexus castenholzii の配列は、890 nm と 3 波長混合光で相対量が増加し(17±4%、15±3% vs. 暗闇条件での11±1%)、この微生物の BChl a の A_{max} 880 nm と一致する(79)。 しかし、Roseiflexus の配列はこれらの光条件だけでなく、全ての培養マットで支配的になっている。これはイエローストーンの温泉から集められた微生物マットと同様で(98)、Roseiflexus が光栄養でも化学合成でも生きられることを反映している。

これら3種の光合成細菌に加え、相対量はやや小さくなるが、4つの光合成細菌の配列; Elioraea sp. (OTU34)、"Ca. Chloranaerofilum sp." (OTU27)、"Ca. Roseilinea sp." (OTU120)、Chloracidobacterium sp. (OTU26)も特定の光条件で増加している(Table 3-5)。例えば、Elioraea sp.は全てのLED光下条件で増加し、特に 890 nm 波長光と3波長混合光条件で最も増加した(3 台全てのFold change が1.5以上)。Elioraea tepidiphila は化学従属栄養と報告されているが(107)、BChl a 合成と酸素非発生型光合成に必要な全ての遺伝子が E. tepidiphila 基本株のゲノムに含まれることとイエローストーン温泉マットでのメタゲノム解析の結果から Elioraea sp.は光合成細菌であると考えられている(98)。さらに、マッシュルーム温泉の微生物マットから採取された Elooraea sp.の単離株"Ca. E. thermophila"は OTU34 と 99%の配列相同性を示しており、BChl a を合成し光栄養的に成長していることが観察されている(114)。相同性が高いことと本実験で

光の下で増加したことから、*Elioraea* sp. OTU23 は光合成によって生息している ことが考えられる。OTU27 配列は光合成細菌"Ca. Chloranaerofilum corporosum"

(Chloroflexi) と高い相同性を示し、周辺温度が最も低い装置3(51℃)でのみ 光の下で増加している(Table 3-5)。これはこの微生物が低い温度を好んでいる ことを示しているのかもしれない。"Ca. Chloranaerofilum corporosum"(OTU27、 98% nt identity) はメタゲノムと自己蛍光の研究によって BChls a と c を発現する ことが報告されており、実験室内で嫌気条件下で光合成的に成長することが観 察されている(114)。そのため、本研究で我々が観察したことは、中房温泉のマ ットで"Ca. Chloranaerofilum sp."が光合成的に成長したことのさらに支持してい る。OTU120 は推定的に光合成細菌であるとされている"Ca. Roseilinea gracile"

(96% nt identity) と相同性を持ち、BChl a を発現していると推測されている未 培養の光合成細菌である(114)。OTU120 は 890 nm 波長光下で約2倍の増加をし ており、光合成的に生育していることが考えられる。興味深いことに、この増 加は主に比較的温度が高い装置1と2で観測されており(Fig 3-5)、本実験条件 下での高温を好んでいるのかもしれない。この糸状酸素非発生型光合成細菌は 酸素を必要とし、Chloroflexi門 Anaerolineae 網に関係している(113,114)。

4 つ目は OTU26 で、BChl c、a を持っている酸素非発生型光従属栄養細菌でア シドバクテリウムの Chloracidobacterium thermophilum (97% nt identity) (115)に 関連している。Chloracidobacterium sp. OTU26 配列は初期マットでは相対量は小 さいが、培養後は暗闇条件と比べて各光下で装置 3 では増加していた(625 nm、 730 nm、890 nm、3 波長混合光でそれぞれ 3.0、2.3、3.0、4.5 倍; Table 3-5)。 これは最も低い温度(51°C)を好んでいることを示していることと光栄養的に 増殖していることを示唆しており、最も相同性がある Chloracidobacterium thermophilum strain B(T)(97% nt identity)の最適温度 51°C とも一致していた(115)。 この光従属栄養細菌は BChl c、a を発現しており、BChl a の最適吸光波長は 745 nm であるので(115)、相対量が主に 730 nm 波長光で増加すると期待していた。 しかし、相対量は 625 nm や 890 nm の波長光でも増加していた。C. thermophilum は低酸素濃度であることが必要で、シアノバクテリアの配列はどの光波長下で も増大していたので、マットが微好気環境になったことが推測される。我々は 様々な光波長の光合成細菌への影響を確かめた。

3.3.6.2 化学合成細菌への光波長の影響

特定の光波長は異なる光合成細菌を活性化させ、化学合成細菌に間接的影響 を与えることが推測される。特に酸素発生型光合成細菌 *Thermosynechococcus* は 625 nm 波長光条件で好気環境や栄養を提供することで他のバクテリアに貢献す

ることが予期される。主要な化学合成細菌(≥1%相対量)は Exilispria sp. OTU5、 Fervidobacterium sp. OTU12、Thermodesulforhabdus sp. OTU28 といったバクテリ アが光環境に依存して相対量が大きく変わっていた(Table 3-3)。この3つのバ クテリアは酸素の影響を受けていることが推測される。Exilispira sp.は絶対嫌気 で化学従属栄養であることが報告されており(116)、625 nm 波長光下で酸素の存 在が予想されている環境との関連が想定される。同様に絶対嫌気である Thermotogae 門の Fervidobacterium riparium (OTU12、99% nt identity) と相同性 を持つ配列は、温度感受性が高いとセクション 3.3.3 「培養マットでのばらつき と温度の影響」で述べているが、625 nm で最小量(1.9±1.2%)で、730 nm で最 大量(4.8±7.3%)であった。このトレンドは最高温度の装置1(55℃)で如実に 見られた(それぞれ 3.1%と 13.2%)。これは基準株の最適温度 65°C を反映して いるのかもしれない(112)。625 nm 波長光条件では Therymosynechococcus sp.によ って酸素が生産され Fervidobacterium riparium の成長が阻害されるのと、元素状 硫黄がこのバクテリアの成長を促進することが報告されているので、 Chloroflexus sp.による元素状硫黄の増加が 730 nm 波長光下での増加につながっ たのかもしれない。最後に、Thermodesulforhabudus を表す配列が、暗闇条件で 最も増加し(3.0±0.5%)、730 nm、890nm、3 波長混合条件で少なかった(それ ぞれ 1.7±0.3%、1.5±0.8%、1.4±0.6%)。この配列は Thermodesulforhabdus sp. M40/2 CIV-3.2 (94% nt identity) & Thermodesulforhabdus norbegicus (92% nt identity) に関連しており、両方ともアセテートを電子ドナーとして硫酸を還元する (117,118)。そのため、この配列はアセテートを利用する Chloroflexus や Roseiflexus の存在下で減少したのかもしれない。

主要ではないが(<1%相対量)、異なる光条件で増加した3種の化学従属栄養 細菌;Meiothermus OTU33、Thermus OTU67、Caldimicrobium OTU45を取り上げ る(Table 3-5)。前2者には酸素濃度の強い影響が予想され、しかし前述の種と は違い、ポジティブな影響が考えられる。Meiothermus と Thermus spp.は絶対好 気従属栄養でThermaceae 科に属し、Themosynechococcus が増加した 625 nm 波長 条件でそれらの配列が増加した。Thermosynechococcus が増加した 625 nm 波長 条件でそれらの配列が増加した。Thermosynechococcus が有機物、酸素、還元性窒素 を従属栄養の Meiothermus に提供し、Meiothermus は Thermosynechococcus のバイ オマス生産効率を向上させシアノバクテリアが発生させた酸素のストレスを軽 減させるという働きをしている(69)。Thermus は Meiothermus と高い相同性を持 っているので、Thermosynechococcus と同様の関係を持っていることが推測され る。シアノバクテリアは異なる従属栄養細菌の成長に貢献しているが (69,119,120)、 我 々 の 実 験 で は Meiothermus と Thermus だ け が Thermosynechococcus と明らかな正の関係を示した。一方で、中房温泉由来の硫 黄不均化細菌 Caldimicrobium thiodismutans に関係する配列は Chloroflexus や Roseiflexus と共に増加し、これらの酸素非発生型光合成細菌が硫黄サイクルに関 して協同していることが推測される。例えば、Chloroflexus aggregans と Roseiflexus castenholzii は SQR 活性を通して硫化水素を酸化している(65,70)。 Chloroflexus で dissimilatory sulfite reductase (dsr) や sulfur oxidation (sox)遺伝子 をコードしているものはおらず、硫化水素培地での培養で細胞まわりに元素状 硫黄の粒子が観測されたことと一致する(65,70,121)。これらのことから、微生物 マットの中で Chloroflexus と Roseiflexus が硫化水素を元素状硫黄に酸化し、それ が Caldmicrobium に不均化されるという硫黄サイクルの存在が示唆される。

一方で、いくつかの配列は暗闇条件で最も多く、光条件で減少することが確認された。50%以上減少したものとしては Thiobacter subterraneus (OTU46、100% nt identity) 配列が 3 波長混合条件でそうであった(Table 3-5)。Thiobacter subterraneus は絶対化学独立栄養細菌で、分子酸素を電子受容体としてチオ硫酸や元素状硫黄を唯一のエネルギー源として酸化する(122)。Thiobacter と Caldimicrobium spp.は両者とも元素状硫黄を電子ドナーとして競合的に利用する。Caldimicrobium は嫌気環境を好むが Thiobacter は酸素を利用するため、Thiobacter は酸素が発生する光条件下で競合的優位性を持ちそうである。しかし、Caldimicrobium sp 配列は 3 波長混合条件でも増加した。一つの可能性としては、基準株で Caldimicrobium thiodismutans の方が Thiobacter subterraneus よりも高 pH 耐性であり(122,123)、シアノバクテリアの独立栄養成長は温泉中の微生物マットで pH をとても高めることができるためであるからかもしれない(124,125)。

3.3.7 温泉水

微生物マットをおおう温泉水は化学物質の供給源なだけでなく、バクテリア のプールでもある。温泉水の菌叢を培養期間中、経時観察した。温泉水の菌叢 はマットコミュニティと多様性でも構成でも全く異なっていた。種の豊富さは マットサンプルよりも高かったが、多様性は減少し不均一になっていた。温泉 水コミュニティは硫黄酸化菌である Sulfurihydrogenibium azorense (OTU3、99% nt identity、相対量は73%から53%へ徐々に減少)を示す配列が支配的で、上流のも っと高温域 (67–75°C) にある糸状バイオフィルムコミュニティの一般的で主要 なメンバーでもある(75)。さらに、*Tepidimonas thermarum* (OTU24、99% nt identity、 相対量は0.01%から10%へ徐々に増加)、*Hydrogenophilus thermoluteolus* (OTU48、 99% nt identity、2±1%)、"Ca. Roseovibrio tepidum" (OTU29、99% nt identity、 相対量が 0.002% から 3%へ徐々に増加)、*Thermus arciformis* (OTU67、99% nt identity、 1.1±0.5%)を示す配列が温泉水から検出された(114,126–128) (Table 3-8)。これ

らの配列は上流の糸状コミュニティ由来のもので、比較的温度が低い本実験環 境には適応していないように見える。しかし、Tepidimonas thermarum OTU24 と "Ca. Roseovibrio tepidum" OTU29 はこの実験環境で徐々に増加している。共通の 特徴は好気性であることと、この温度に適応していることが考えられる。 Tepidimonas thermarum は絶対好気性で最適温度は約 50-55℃ である(126)。さら に、OTU29 は好気性で酸素非発生型光合成細菌"Ca. Roseovibrio tepidum"(114)と 99%の相同性、好気性で 55℃(最適温度 40-50°C) まで生育できる Roseomonas alkaliterrae(129)とは 96%相同性を持っている。これらの生育温度はサンプリン グ場所(~56℃、T1 in Fig 3-5)と関係しているであろう。好気環境に関しては、 酸素を生産する Thermosynechococcus sp.が Chloroflexusa aggregans と共に増加し ており、それぞれ 0.001%から 2.5%、0.1%から 2%になった(Table 3-8)。実験 環境の水路は人工的に作ったもので、実験開始当初は光照射装置周辺には微生 物マットは存在しなかった。培養期間中に Thermosynechococcus と Chloroflexus spp.に関連する配列の増加が確認され、薄い緑色の微生物マットが装置周辺の底 に形成した。そのため、Thermosynechococcus sp.と Chloroflexus aggregans 配列が 温泉水から検出されたのは、温泉水サンプル中に若いマットが解離してしまっ た可能性がある。しかし、*Thiobacter* sp. OTU46(温泉水で 0.6%)は初期マット から検出されなかったが、20 日間の培養後には微生物マットから検出された (625 nm 波長条件で最大で 0.8%)。これは、周辺の温泉水から微生物マットへ 微生物が侵入したことを示唆しているかもしれない。さらに、初期温泉水では あまり検出されなかったが、相対量の小さい微生物もマットに侵入しその存在 量を増すことは考えられる。我々は温泉水が化学成分の供給源なだけでなく、 微生物の供給源でもありうることを確かめた。

3.4 まとめ

この章では、温泉中の微生物マット内で光合成細菌を活性化したときに化学 合成細菌に与える影響を16SrRNA遺伝子配列を用いて調べた。微生物マットの ように厚さと粘性があるサンプルでも特定の光波長を照射することで、in situ で もそれに対応した光合成細菌が、*Thermosynechococcus*のように酸素発生型光合 成細菌でも、*Chloroflexus や Roseiflexus*のように酸素非発生型光合成細菌でも特 異的に活性化できることが分かった。また、光合成細菌と関係が深い微生物の 増減は制御できることも確認した。一方で、今回の実験のようにバイオマスや 温泉水からの栄養が豊富だと考えられる環境のためか、光合成細菌からの影響 が弱い微生物や相関をほとんど持たない微生物も多く存在した。温度を高める ことによって種の豊富さが減少したことも示しているように環境の影響は大き く、環境によって相互作用の強さを変え得ることも分かった。今後は菌叢だけ でなく、転写物・代謝物それに酸素などの環境因子も継時的に測定できるよう にすれば、微生物間の相互作用のより詳細な解明だけでなく、微生物共生系の 制御システムとしても役立つであろう。



Figure 3-1 光合成微生物マットの概念図

光合成細菌であるシアノバクテリアは CO₂ を固定し従属栄養細菌が利用できる 有機物を放出する。糸状の酸素非発生型光合成細菌は硫化水素を酸化し元素状 硫黄を産出し、他のバクテリアと硫黄サイクルを構築している。



Figure 3-2 中房温泉の Wall site での壁面と Site B での水路 中房温泉は (A) Wall site (36°23'20''N、137°44'53''E)、(B) Site B (36°23'33''N、 137°44'53''E) という噴出口を持つ。



Figure 3-3 中房温泉での初期微生物マットの採取場所

微生物マットは Wall site の赤枠でかこんだ場所で 2016 年 5 月 30 日に採取された。この微生物マットは約1 cm の厚さで上層が緑で下層がピンク色をしていた。



Figure 3-4 撹拌した微生物マットの光照射装置への設置

装置(a)に微生物マットを満たし(b)、上部に3mmのすきまが空いた状態で カバーをした(c)。

Device #1	
#2	
#3	
1	T4

Temp. [°C]	T1	T2	Т3	T4		рН
0 th day	58	56	55	53	0 th day	7.40
7 th day	57	54	53	50	7 st day	7.10
14 th day	53.5	52.5	50	46.5	14 th day	7.47
20 th day	57	54.5	52	49	20 th day	7.30
Ave.	56.4	54.3	52.5	49.6	Ave.	7.32

Figure 3-5 実験中の温度と pH

装置の左右での温度の違いはわずかであった(<0.5°C)。



Figure 3-6 光照射装置

装置は5つの流路から成り、暗闇、625 nm 波長光、730 nm 波長光、890 nm 波長 光、3 波長混合の条件となっている。微生物マットはくぼみに設置され、クリア カバーをつけ、20 日間の光照射が行われる。



Figure 3-7 20 日間での微生物マット回復 初期微生物マットを採取した場所では 20 日後にマットが再形成していた。



Figure 3-8 LED の光強度

3 つの LED の分光放射照度を 30 cm と 50 cm の距離で測定した: (a) 625 nm 波 長用の OSR5CA5B61P、 (b) 730 nm 波長用の SX534IR-730、 (c) 890 nm 波長 用の TSHF5410。



Figure 3-9 各波長での微生物マットの培養

(a) 培養期間中の平均温度と pH。(b) 異なる光条件で培養された微生物マットの見た目の変化。



Figure 3-10 一級生物マットと温泉水のコミュニアイメンバーの相対重の遅い コミュニティメンバーの相対量は、培養前の微生物マット(IM)を3サンプル、 625 nm 波長光、730 nm 波長光、890 nm 波長光で20日間培養された装置3台分 の微生物マットを16S rRNA 遺伝子解析した。暗闇と3波長混合条件はコントロ ールでもある。装置周辺の温泉水は0、7、14、20日目に継時的に採取した(そ れぞれ HSW w0、w1、w2、w3)。培養後の微生物マットで装置3台分の平均相 対量がいずれかの光条件で1%以上になった主要な微生物、3種の光合成細菌、 温泉水中で支配的な *Sulfurihydrogenibium* sp. (OTU3)を表示した。









Figure 3-11 主要なメンバーの配列と、特定の光条件で増加/減少したメンバーの配列を基とした系統樹

系統樹は以下のそれぞれの門の系統的関係性を示したもので、過去に中房温泉から採取された配列(太字)と本研究の配列(太字、赤字)が示されている:

(A) Chloroflexi、Firmicutes、Dictyoglomi、(B) Chlorobi、Hydrogenedentes、
Planctomycetes、(C) Proteobacteria、Thermotogae、EM3、(D) その他の多様な
門。



Figure 3-12 装置 1 の 730 nm 波長光培養後の微生物マットの層構造形成 微生物マットの上層約 3 mm が茶色の層、その下に約 2 mm のオレンジ-ピンク の層が形成された。これは他の装置でも見られた。



Figure 3-13 Shannon Diversity Index の Rarefaction curves (n=10、平均±1SE)



Figure 3-14 Chao1 の Rarefaction curves (n=10、平均±1SE)



Figure 3-15 observed OTUs の Rarefaction curves (n=10、平均±1SE)



Figure 3-16 Equitability の Rarefaction curves (n=10、平均±1SE)



Fold-change of relative abundance

Figure 3-17 それぞれの光条件での相対量 Fold change の片対数ヒストグラム 暗闇条件をコントロールとした、それぞれの OTU の相対量の Fold change をヒ ストグラムとして、装置 1、2、3 を青、オレンジ、緑で表すことによって表示 する。対数の底は 51/12 としている。

Table 3-1 16S rRNA	A 遺伝子配列に使ったフ	゚ライマー
--------------------	-----------------	-------

sample	primer name	sequence
forward primer		
all samples	ORI342F1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTACGGGGGGGG
reverse primer		
dark device 1	ORI806R15	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGCCACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
625nm device 1	ORI806R16	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAAACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
730nm device 1	ORI806R17	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
890nm device 1	ORI806R18	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCACTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
3LEDs device 1	ORI806R12	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCTACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
dark device 2	ORI806R7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
625nm device 2	ORI806R6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
730nm device 2	ORI806R5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
890nm device 2	ORI806R11	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGACGGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
3LEDs device 2	ORI806R14	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTTCACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
dark device 3	ORI806R4	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
625nm device 3	ORI806R9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAACTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
730nm device 3	ORI806R8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
890nm device 3	ORI806R10	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
3LEDs device 3	ORI806R13	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGGACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
hot spring water 0th	ORI806R26	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
hot spring water 7th	ORI806R27	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGGAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
hot spring water 14th	ORI806R28	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTTTTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT
hot spring water 20th	ORI806R29	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAGTTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT

Table 3-2 16S rRNA 遺伝子配列による種分類のための配列の処理

MiSeq が出力した配列(Total number of sequences)から Phix ゲノムを取り除いた(Phix genome removed sequences)。次いでクオリティフィルタリングなど処理をし(trimmed/processed sequeces)、OTU にクラスタリングした。

	dark#1	dark#2	dark#3	625nm#1	625nm#2	625nm#3	730nm#1	730nm#2	730nm#3	890nm#1	890nm#2	890nm#3
Total number of sequences	459615	362820	339120	341643	255044	308537	392292	377395	363672	372913	325411	394033
Phix genome removed sequences	356178	311856	306288	297113	222903	278635	314568	294940	315661	314083	281806	345422
Trimmed/processed sequences	136007	140028	153254	119122	94192	126008	138429	124185	120964	135170	116351	126606
OTUs	351	373	371	348	326	381	332	355	396	338	370	378
	3LEDs#1	3LEDs#2	3LEDs#3	INI_1	INI_2	INI_3	HSW_w0	HSW_w1	HSW_w2	HSW_w3		
Total number of sequences	3LEDs#1 362422	3LEDs#2 394428	3LEDs#3 366616	INI_1 335344	INI_2 357374	INI_3 359330	HSW_w0 359330	HSW_w1 389863	HSW_w2 278605	HSW_w3 252583		
Total number of sequences Phix genome removed sequences	3LEDs#1 362422 323651	3LEDs#2 394428 326327	3LEDs#3 366616 303768	INI_1 335344 294210	INI_2 357374 300785	INI_3 359330 259186	HSW_w0 359330 308625	HSW_w1 389863 309469	HSW_w2 278605 234430	HSW_w3 252583 214491		
Total number of sequences Phix genome removed sequences Trimmed/processed sequences	3LEDs#1 362422 323651 119654	3LEDs#2 394428 326327 128079	3LEDs#3 366616 303768 130467	INI_1 335344 294210 115579	INI_2 357374 300785 121624	INI_3 359330 259186 100773	HSW_w0 359330 308625 163389	HSW_w1 389863 309469 176818	HSW_w2 278605 234430 135270	HSW_w3 252583 214491 119840	-	

Table 3-3 培養マットで相対量が1%以上の主要なメンバーと、ターゲットのシアノバクテリアと、温泉水中で支配的なバクテリア BLAST サーチによる近縁種をリストしている。

OTU			Re	lative abun	lance (aver	age)		BLAST (all)			
ID	Taxa	Dark	625nm	730nm	890nm	3LEDs	$\mathbf{I}\mathbf{M}^{\dagger}$	BLAST (typestrain)	acc. No.	Identity	e-value
								Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%	0
OTU2	Chloroflexi, Roseiflexus	10.8%	13.4%	9.3%	17.3%	14.7%	28.9%	Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%	0
0.0001110		0.00/	1 10/	4.00/	1.00/	0.10/	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01		AB685439.1	100%	0
01010	Chioroflexi, Chioroflexus	0.3%	1.1%	4.6%	1.0%	3.1%	3.8%	Chloroflexus aggregans DSM 9485	CP001337.1	99%	0
OTU7	Cyanobacteria,	0.0%	0.99/	0.10/	0.10/	0.90/	C 20/	Thermosynechococcus sp. NK55	CP006735.1	100%	0
0107	Thermosynechococcus	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%	6.3%	Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%	2E-150
OTUI	A	15 60/	15 70/	15 00/	19.00/	15 00/	7.99/	hot spring uncultured bacterium clone TP54	EF205567.2	100%	0
0101	Armatimonadetes, unc.	15.6%	10.7%	15.0%	12.9%	15.0%	1.2%	Pelotomaculum thermopropionicum SI	AP009389.1	85%	4E-113
OTUS	Spirachaotao Evilianira	19 504	7 104	10.0%	5 504	8 004	0.0%	thermophilic uncultured bacterium clone HMTAb111	KM373086.1	99%	0
0105	Spirochaetae, Exhispira	12.070	7.170	10.970	0.070	0.070	0.076	Exilispira thermophila strain RASEN	NR_041644.1	85%	5E-112
OTU4	Hudnessen dentes uns	6 59/	7.09/	Q 70/	0.00/	0.00/	1 50/	hot spring ucultured bacterium clone H4-B73	FJ207011.1	99%	0
0104	Hydrogenedentes, unc.	0.3%	7.9%	0.170	0.270	0.070	1.070	Aliifodinibius sediminis strain YIM J21	NR_118429.1	80%	3E-69
OTUO	Nitrospirae,	4.09/	4.09/	2.60/	4 90/	9 10/	0.79/	hot spring uncultured bacterium clone NKB_63_50	JF826987.1	100%	0
0109	Thermodesulfovibrio	4.0%	4.0%	3.6%	4.2%	3.1%	0.7%	Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347	CP001147.1	97%	0
OTUS	Chlovohi Ionovihostovium	2 604	2 404	2 60/	2 60/	4 104	1 904	hot spring uncultured bacterium clone OTU42/APA	AM902626.1	98%	0
0108	Chiorobi, ignavibacterium	2.070	5.470	5.070	3.070	4.170	1.270	Ignavibacterium album JCM 16511	CP003418.1	97%	0
OTU19	Thermotogae,	2 604	1 00/	4 80/	2 004	2 004	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_43	AB685429.1	100%	0
01012	Fervidobacterium	3.0%	1.970	4.070	3.370	3.070	0.076	Fervidobacterium riparium strain 1445t	NR_108234.1	99%	0
OTUC	Chloroflovi Caldilinaa	9.40/	4 90/	9.70/	9 40/	9 40/	0.49/	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%	0
0106	Chloronexi, Caldinnea	0.470	4.070	2.170	J.470	0.470	9.470	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%	0
OTU11	Atmatimonadetes,	2.3%	2.7%	1.7%	2.1%	2.1%	2.6%	hot spring uncultured bacterium clone TP125	EF205572.1	99%	0

			1	1	1		1		1 1	, · · · ·	1
	Chthonomonadales							Thermanaerovibrio acidaminovorans strain DSM 6589	NR_074520.1	85%	3E-109
071199	Deltaproteobacteria,	2.00/	9.90/	1 70/	1 50/	1 40/	0.0%	thermophilic uncultured delta proteobacterium clone B8-67	KF448110.1	100%	0
01028	Thermodesulforhabdus	5.0%	2.270	1.770	1.5%	1.470	0.0%	Thermodesulforhabdus norvegica strain A8444	NR_025970.1	92%	5E-157
								hot spring uncultured bacterium clone Alla11otu15-1	KP676769.1	100%	0
OTU13	Acidobacteria, SJA-149	1.7%	1.7%	1.6%	2.2%	2.1%	2.4%	Paludibaculum fermentans strain P105	NR_134120.1	95%	2E-180
								thermophilic uncultured bacterium clone OTU10	 KP677522 1	100%	0
OTU14	Chloroflexi, Bellilinea	1.8%	1.9%	1.7%	1.7%	1.9%	1.5%	Bollilinoo coldifictuloo strain COMI-1	NR 041354 1	100%	0
									0022000202.1	000/	0
OTU16	Chlorobi, OPB56	1.6%	1.4%	1.3%	2.0%	1.7%	0.9%	not spring uncultured bacterium clone ZB_P14_C06	GQ328682.1	99%	0
		-						Thermosulfidibacter takaii ABI70S6	AP013035.1	82%	5E-87
077110	Chloroflexi,	1.00/	1.00/	1 50/	1.00/	1.00/	0.00/	thermophilic uncultured bacterium clone MJBB-C151	LN998886.1	99%	0
01018	Anaerolineaceae	1.8%	1.8%	1.0%	1.2%	1.2%	0.0%	Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1	NR_041354.1	94%	2E-170
								hot spring uncultured bacterium clone TP149	EF205586.1	93%	2E-167
OTU21	Hydrogenedentes	2.0%	1.0%	1.2%	1.2%	1.2%	0.0%	Paracoccus laeviglucosivorans strain 43P	NR 1456401	83%	3E-64
								hot spring uncultured bacterium clone NKB 56 112	JF826976 1	100%	0
OTU25	Chlorobi, SM1H02	1.1%	1.2%	0.9%	1.3%	1.1%	0.9%	In the second se	ND 054000 1	10070	0
								Ignavibacterium album strain JCM 16511	NR_074698.1	88%	3E-134
071197	Chloroflexi, Ca.	0.6%	0.7%	0.6%	9 904	0.7%	0.0%	hot spring uncultured Chloroflexi bacterium clone OB17	EF429491.2	100%	0
01027	Chloranaerofilum	0.070	0.770	0.0%	2.270	0.770	0.370	Oscillochloris trichoides strain DG-6	NR_114470.1	92%	2E-160
	Firmicutes,							thermophilic uncultured bacterium clone 9B-63	JX298766.1	99%	0
OTU30	Ruminiclostridium	0.6%	0.4%	1.8%	0.9%	0.6%	0.1%	Ruminiclostridium thermocellum strain ATCC 27405	NR 074629.1	93%	1E-168
	Chloroflexi							hot spring uncultured bacterium clone msunder68	KX213962 1	99%	0
OTU35	Anoorolinoorliko	0.9%	1.0%	0.8%	0.8%	0.7%	1.1%		ND 199909 1	000/	FE-109
	Anaeronnea-nke							Thermomariniinea facuniiontana strain Sw7	NK_132293.1	92%	9E-162
OTU23	Armatimonadetes unc	0.9%	1.1%	0.7%	0.7%	0.8%	1.8%	hot spring uncultured bacterium clone $NKB_{56}N2$	JF826973.1	100%	0
01020	in mannonaceos, and.	0.070	1.1/0	0.170	0.170	0.070	1.070	Thermosediminibacter oceani DSM 16646	CP002131.1	85%	5E-112
	Chloroflexi,							thermophilic uncultured Chloroflexi bacterium clone			
OTU40	Anaerolineaceae	0.8%	1.2%	0.8%	0.5%	0.6%	0.3%	DSEP_96	HM991557.1	100%	0
								=			

								Thermanaerothrix daxensis strain GNS-1	NR_117865.1	87%	2E-125
OTU3	Aquificae, Sulfurihydrogenibium	0.3%	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	2.5%	hot spring uncultured Aquificaceae bacterium clone ST-B02_2 Sulfurihydrogenibium azorense strain Az-Fu1	AB735170.1 NR 102858.1	100% 99%	0

†IM:初期マット

Table 3-4 Table 3-3 でリストした主要メンバーの3台の装置間での相対量の標準偏差と変動係数(†IM: initial mat)

				Standard	deviation			Coefficient of variation					
OTU ID	Taxa	Dark	625nm	730nm	890nm	3LEDs	\mathbf{IM}^{\dagger}	Dark	625nm	730nm	890nm	3LEDs	IM†
OTU2	Chloroflexi, Roseiflexus	0.7%	4.2%	2.2%	3.9%	3.2%	1.1%	0.06	0.32	0.24	0.23	0.22	0.04
OTU10	Chloroflexi, Chloroflexus	0.1%	0.5%	1.3%	0.6%	0.4%	0.4%	0.41	0.44	0.29	0.57	0.14	0.1
OTU7	Cyanobacteria, Thermosynechococcus	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.9%	0.67	0.23	0.76	0.11	0.22	0.15
OTU1	Armatimonadetes, unc.	1.2%	2.8%	2.4%	3.8%	2.8%	0.5%	0.08	0.18	0.16	0.29	0.19	0.07
OTU5	Spirochaetae, Exilispira	5.5%	0.1%	4.0%	1.7%	5.5%	0.0%	0.44	0.01	0.37	0.31	0.69	0.59
OTU4	Hydrogenedentes, unc.	4.2%	4.2%	4.8%	5.2%	4.4%	0.3%	0.64	0.54	0.54	0.64	0.51	0.2
OTU9	Nitrospirae, Thermodesulfovibrio	1.1%	0.6%	1.4%	1.3%	0.4%	0.0%	0.26	0.16	0.38	0.31	0.14	0.05
OTU8	Chlorobi, Ignavibacterium	1.3%	0.4%	1.8%	0.2%	1.0%	0.2%	0.49	0.11	0.5	0.06	0.24	0.15
OTU12	Thermotogae, Fervidobacterium	2.4%	1.2%	7.3%	2.8%	1.7%	0.0%	0.66	0.66	1.52	0.72	0.56	0.48
OTU6	Chloroflexi, Caldilinea	0.2%	1.2%	0.4%	1.3%	0.5%	2.1%	0.04	0.28	0.16	0.38	0.15	0.23
OTU11	Atmatimonadetes, Chthonomonadales	0.1%	0.5%	0.2%	0.8%	0.4%	0.4%	0.05	0.2	0.1	0.39	0.18	0.17
OTU28	Deltaproteobacteria, Thermodesulforhabdus	0.5%	0.4%	0.3%	0.8%	0.6%	0.0%	0.16	0.19	0.19	0.53	0.43	0.36
OTU13	Acidobacteria, SJA-149	0.2%	0.2%	0.4%	0.3%	0.3%	0.1%	0.11	0.14	0.25	0.11	0.14	0.03

OTU14	Chloroflexi, Bellilinea	0.1%	0.3%	0.9%	0.5%	0.5%	0.1%	0.06	0.15	0.54	0.27	0.24	0.04
OTU16	Chlorobi, OPB56	0.2%	0.4%	0.2%	0.1%	0.3%	0.1%	0.14	0.3	0.19	0.06	0.18	0.09
OTU18	Chloroflexi, Anaerolineaceae	0.6%	0.6%	0.8%	0.2%	0.5%	0.0%	0.36	0.33	0.53	0.16	0.39	0.46
OTU21	Hydrogenedentes	1.2%	0.4%	1.0%	0.6%	0.7%	0.0%	0.61	0.41	0.85	0.56	0.56	0.45
OTU25	Chlorobi, SM1H02	0.2%	0.4%	0.2%	0.5%	0.1%	0.1%	0.14	0.38	0.18	0.41	0.13	0.11
OTU27	Chloroflexi, Ca. Chloranaerofilum	0.2%	0.2%	0.2%	2.9%	0.4%	0.4%	0.33	0.35	0.26	1.35	0.54	0.39
OTU30	Firmicutes, Ruminiclostridium	0.1%	0.3%	2.6%	0.3%	0.3%	0.0%	0.17	0.86	1.43	0.32	0.59	0.22
OTU35	Chloroflexi, Anaerolinea-like	0.3%	0.1%	0.4%	0.2%	0.0%	0.1%	0.3	0.06	0.56	0.23	0.06	0.1
OTU23	Armatimonadetes, unc.	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.24	0.09	0.13	0.26	0.16	0.12
OTU40	Chloroflexi, Anaerolineaceae	0.3%	0.9%	0.4%	0.0%	0.1%	0.0%	0.32	0.74	0.54	0.05	0.13	0.15
OTU3	Aquificae, Sulfurihydrogenibium	0.1%	0.0%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.42	0.14	0.39	0.59	0.33	0.09

					R	Relative a	abundanc	e						
OTU ID	Taxa	Da	rk	625	nm	730	nm	890	nm	3LI	EDs	DLASI (all) BLAST (typestrain)	acc. No.	Identity
		Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	DLASI (typestrain)		
OTU2	Chloroflexi, Roseiflexus	10.8%	0.7%	13.4%	4.2%	9.3%	2.2%	17.3%	3.9%	14.7%	3.2%	Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%
OTU10	Chloroflevi Chloroflevus	0.3%	0.1%	1 1%	0.5%	1.6%	1 3%	1.0%	0.6%	3 1%	0.4%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01	AB685439.1	100%
01010	Chloronexi, Chloronexus	0.370	0.170	1.170	0.570	4.070	1.370	1.070	0.070	5.170	0.470	Chloroflexus aggregans DSM 9485	CP001337.1	99%
OTU7	Cyanobacteria. Thermosynechococcus	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.3%	0.1%	Thermosynechococcus sp. NK55	CP006735.1	100%
0107	Cyanobacteria, mermosyneenococcus	0.070	0.070	0.270	0.170	0.170	0.070	0.170	0.070	0.370	0.170	Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%
OTU34	Alphanroteobacteria, Elioraea	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_52_Y	JF827012.1	99%
01054	Арпаріособастегіа, Епогаса	0.070	0.070	0.070	0.070	0.170	0.070	0.170	0.170	0.270	0.170	Elioraea tepidiphila strain TU-7	NR_044259.1	96%
OTU27	Chloroflevi Chloroflevaceae	0.6%	0.2%	0.7%	0.2%	0.6%	0.2%	2.2%	2.0%	0.7%	0.4%	hot spring uncultured Chloroflexi bacterium clone OB17	EF429491.2	100%
01027	Chloronexi, Chloronexaceae	0.070	0.270	0.770	0.270	0.070	0.270	2.270	2.970	0.770	0.470	Oscillochloris trichoides strain DG-6	NR_114470.1	92%
OTU120	Chloroflevi Ca. Roseilinea	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_52_A	JF826964.1	99%
010120	Chloronexi, Ca. Rosenniea	0.0%	0.0%	0.070	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	Thermomarinilinea lacunifontana strain SW7	NR_132293.1	88%
0TU26	Acidobacteria, Chloracidobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	hot spring uncultured Acidobacteria bacterium clone TP32	EF205575.1	99%
01020	Actiobacteria, enioractiobacterium	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070	Chloracidobacterium thermophilum strain B	NR_074296.1	97%
OTU5	Spirochaetae Exilispira	12.5%	5 5%	7 1%	0.1%	10.9%	4 0%	5 5%	1 7%	8.0%	5 5%	thermophilic uncultured bacterium clone HMTAb111	KM373086.1	99%
0105	Spiroenaetae, Exilispira	12.370	5.570	7.170	0.170	10.770	4.070	5.570	1.770	0.070	5.570	Exilispira thermophila strain RASEN	NR_041644.1	85%
OTU12	Thermotogae Fervidobacterium	3.6%	2 4%	1.9%	1.2%	4.8%	7 3%	3.9%	2.8%	3.0%	1 7%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_43	AB685429.1	100%
01012	memologae, rervidobaetenam	5.070	2.470	1.770	1.270	4.070	7.370	5.770	2.070	5.070	1.770	Fervidobacterium riparium strain 1445t	NR_108234.1	99%
OTU28	Deltaproteobacteria. Thermodesulforbabdus	3.0%	0.5%	2 2%	0.4%	1 7%	0.3%	1.5%	0.8%	1.4%	0.6%	thermophilic uncultured delta proteobacterium clone B8-67	KF448110.1	100%
01020	Denaproceobacteria; mermodesuitornabeus	5.070	0.570	2.270	0.470	1.770	0.370	1.570	0.070	1.470	0.070	Thermodesulforhabdus norvegica strain A8444	NR_025970.1	92%
OTU33	Deinococcus-Thermus, Meiothermus	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	Meiothermus hypogaeus strain AZM34c11	NR_113226.1	100%
OTU67	Dainogoggus Thormus Thormus	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_58_047	JF826980.1	100%
01007	Demococcus-mermus, mermus	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	Thermus arciformis strain TH92	NR_116251.1	99%
OTU45	Thermodesulfobacteria, Caldimicrobium	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.3%	0.1%	0.5%	0.4%	0.6%	0.1%	Caldimicrobium thiodismutans	AP014945.1	100%
0771120		0.60	0.10/	0.40/	0.20/	1.00/	0.694	0.00/	0.20/	0.60/	0.00/	thermophilic uncultured bacterium clone 9B-63	JX298766.1	99%
01030	Firmicutes, Ruminiclostridium I	0.6%	0.1%	0.4%	0.3%	1.8%	2.6%	0.9%	0.3%	0.6%	0.3%	Ruminiclostridium thermocellum strain ATCC 27405	NR_074629.1	93%
OTUAL		0.10/	0.10/	0.40/	0.20/	0.70/	0.00/	0.50/	0.40/	0.40/	0.40/	uncultured soil bacterium clone S1P5011	KF145488.1	95%
01041	Chiorodi, SJA-28	0.1%	0.1%	0.4%	0.3%	0.7%	0.8%	0.5%	0.4%	0.4%	0.4%	Desulforegula conservatrix strain Mb1Pa	NR_028780.1	82%
OTU46	Proteobacteria, Thiobacter	0.8%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	0.3%	0.7%	0.3%	0.4%	0.2%	Thiobacter subterraneus strain C55	NR_024834.1	100%

Table 3-5 光による影響を受けた微生物マットメンバー

	Shannon	Chao1	OTUs	Coverage [†]	Equitability
dark 1	5.07	394	351	89%	0.6
dark 2	5.33	412	373	90%	0.62
dark 3	5.22	424	371	87%	0.61
625nm 1	5.19	409	348	85%	0.61
625nm 2	5.32	347	326	94%	0.64
625nm 3	5.44	411	381	93%	0.63
730nm 1	4.78	357	332	93%	0.57
730nm 2	5.19	394	355	90%	0.61
730nm 3	5.36	444	396	89%	0.62
890nm 1	5.13	381	338	89%	0.61
890nm 2	5.12	421	370	88%	0.6
890nm 3	5.4	401	378	94%	0.63
3LEDs 1	5.34	375	358	95%	0.63
3LEDs 2	5.18	386	357	93%	0.61
3LEDs 3	5.12	416	369	89%	0.6
IM 1	4.71	346	326	94%	0.56
IM 2	4.71	374	352	94%	0.56
IM 3	4.64	337	324	96%	0.56
HSW w0	2.8	694	685	99%	0.3
HSW w1	2.67	613	447	73%	0.3
HSW w2	2.57	506	429	85%	0.29
HSW w3	3.36	494	385	78%	0.39
Average	4.71	424	380	90%	0.55
SD	0.94	86	75	6%	0.12

Table 3-6 培養後の微生物マット、初期マット、温泉水サンプルの多様性

†Coverage: Chao1 推測値の内の観測された OTU 数の割合

Table 3-7 初期マットで相対量が1%以上であった主要なメンバー

オレンジと青のハイライトは20日間培養で相対量を増やしたものと減らしたものをそれぞれ示している。

OTU	Taxa	Relative abundance												
		Initial mat						Experimental mats (Ave.)				DLASI (all) BLAST (typostroin)	acc. No.	Identity
IIV		1	2	3	Ave.	SD	Dark	625 nm	730 nm	890 nm	3 LEDs	DLASI (typestiani)		
OTU2	Chloroflexi, Roseiflexus	28.6%	28.0%	30.2%	28.9%	1.1%	10.8%	13.4%	9.3%	17.3%	14.7%	Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%
OTUG	Chloroflavi Caldilinaa	7.0%	0.8%	11 204	0.4%	2 104	2 /0/	4 204	2 704	2 /0/	2 /0/	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%
0100	Chioronexi, Caldillea	7.070	9.870	11.2/0	9.470	2.170	3.470	4.370	2.770	5.470	5.470	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%
OTUI	Armatimonadetes unc	7 4%	7 5%	67%	7.2%	0.5%	15.6%	15 7%	15.0%	12.9%	15.0%	hot spring uncultured bacterium clone TP54	EF205567.2	100%
0101	A finationadotes, une.	7.470	7.570	0.770	7.270	0.570	15.070	13.770	15.070	12.970	15.070	Pelotomaculum thermopropionicum SI	AP009389.1	85%
OTU7	Cyanobacteria, Thermosynechococcus	6.9%	6.8%	5.3%	6.3%	0.9%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%	Thermosynechococcus sp. NK55	CP006735.1	100%
												Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%
OTU26	Acidobacteria, Chloracidobacterium	5.6%	3.4%	2.6%	3.9%	1.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone TP32	EF205575.1	99%
01020												Chloracidobacterium thermophilum strain B	NR_074296.1	97%
OTU10	Chloroflexi, Chloroflexus	4.0%	4.0%	3.3%	3.8%	0.4%	0.3%	1.1%	4.6%	1.0%	3.1%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01	AB685439.1	100%
											5.170	Chloroflexus aggregans DSM 9485	CP001337.1	99%
OTU15	Gammaproteobacteria, Xanthomonadaceae	3.6%	2.8%	3.1%	3.2%	0.4%	0.5%	0.7%	0.3%	0.4%	0.6%	hot spring uncultured bacterium clone Alla11otu10-1	KP676764.1	99%
01015												Aquimonas voraii strain GPTSA 20	NR_042968.1	89%
OTU11	Atmatimonadetes, Chthonomonadales	2.0%	2.8%	2.8%	2.6%	0.4%	2.3%	2.7%	1.7%	2.1%	2.1%	hot spring uncultured bacterium clone TP125	EF205572.1	99%
01011												Thermanaerovibrio acidaminovorans strain DSM 6589	NR_074520.1	85%
OTU3	Aquificae Sulfuribydrogenibium	2.6%	2.7%	2.3%	2.5%	0.2%	0.3%	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	hot spring uncultured Aquificaceae bacterium clone ST-B02_2	AB735170.1	100%
0105	Aquincae, Suntrinytrogenistani	2.070	2.170	2.370	2.370	0.270	0.370	0.270	0.270	0.570	0.370	Sulfurihydrogenibium azorense strain Az-Ful	NR_102858.1	99%
OTU13	Acidobacteria, SJA-149	2.4%	2.3%	2.4%	2.4%	0.1%	1.7%	1.7%	1.6%	2.2%	2.1%	hot spring uncultured bacterium clone Alla11otu15-1	KP676769.1	100%
												Paludibaculum fermentans strain P105	NR_134120.1	95%
OTU23	Armatimonadetes unc	1 7%	2.1%	1 7%	1.8%	0.2%	0.9%	1.1%	0.7%	0.7%	0.8%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_56_N2	JF826973.1	100%
01025	A mathematicates, une.	1.770	2.170	1.770	1.070	0.270	0.970	1.170	0.770	0.770	0.070	Thermosediminibacter oceani DSM 16646	CP002131.1	85%
OTU34	Alphaproteobacteria, Elioraea	2.2%	1.5%	1.5%	1.7%	0.4%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.2%	hot spring uncultured bacteirum clone NKB_52_Y	JF827012.1	99%
01034												Elioraea tepidiphila strain TU-7	NR_044259.1	96%
OTU14	Chloroflexi, Bellilinea	1.5%	1.5%	1.6%	1.5%	0.1%	1.8%	1.9%	1.7%	1.7%	1.9%	thermophilic uncultured bacterium clone OTU10	KP677522.1	100%
01014												Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1	NR_041354.1	100%
OTU	Hydrogenedentes unc	1.4%	1.2%	1.8%	1.5%	0.3%	6.5%	7.004	8 7%	8 7%	8 80%	hot spring ucultured bacterium clone H4-B73	FJ207011.1	99%
0104	Hydrogenedentes, une.	1.470	1.270	1.070	1.570	0.370	0.370	1.970	0.770	0.270	0.070	Aliifodinibius sediminis strain YIM J21	NR_118429.1	80%
OTU8	Chlorobi, Ignavibacterium	1.4%	1.1%	1.0%	1.2%	0.2%	2.6%	3.4%	3.6%	3.6%	4 1%	hot spring uncultured bacterium clone OTU42/APA	AM902626.1	98%
											7.170	Ignavibacterium album JCM 16511	CP003418.1	97%
OTU35	Chloroflexi, Anaerolinea-like	1.0%	1.2%	1.1%	1.1%	0.1%	0.9%	1.0%	0.8%	0.8%	0.7%	hot spring uncultured bacterium clone msunder68	KX213962.1	99%
01035											0.770	Thermomarinilinea lacunifontana strain SW7	NR_132293.1	92%

Table 3-8 温泉水サンプルで相対量が 0.5%以上だった主要なメンバー

			k	Relative a	abundanc	e		BLAST (all)		
OTU ID	Taxa	Hot spring water						BLAST (no Env)	acc. No.	Identity
		0th	7th	14th	20th	Ave.	SD	BLAST (typestrain)		
OTU3	Aquificae Sulfuribydrogenibium	72.7%	65.1%	68.6%	53.5%	65.0%	8.2%	hot spring uncultured Aquificaceae bacterium clone ST-B02_2	AB735170.1	100%
0105	Aquineae, Bunaniya ogenibiani							Sulfurihydrogenibium azorense strain Az-Fu1	NR_102858.1	99%
OTU24	Proteobacteria, Tepidimonas	0.0%	5.6%	4.3%	10.2%	5.0%	4.2%	Tepidimonas thermarum strain AA-1	NR_042418.1	99%
OTU10	Elusimicrobia Lineage IV	0.7%	6.6%	5.7%	4.4%	4.3%	2.6%	hot spring uncultured bacterium clone NKB3-4	FR691802.1	99%
01019	Elusimierobia, Eliteage IV							Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus strain Hbr5	NR_044075.1	84%
OTU48	Proteobacteria, Hydrogenophilus	2.6%	1.4%	0.6%	1.7%	1.6%	0.8%	Hydrogenophilus thermoluteolus strain NBRC 14978	NR_113716.1	99%
OTU7	Cyanobacteria, Thermosynechococcus	0.0%	0.9%	2.3%	2.5%	1.4%	1.2%	Thermosynechococcus sp. NK55	CP006735.1	100%
								Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%
OTU29	Proteobacteria, Acetobacteraceae	0.0%	0.7%	1.5%	3.0%	1.3%	1.3%	hot spring uncultured bacterium clone Alla11otu18-1	KP676772.1	99%
								Roseomonas alkaliterrae strain YIM 78007	NR_134161.1	96%
OTU44	Proteobacteria, Hydrogenophilaceae	1.2%	0.9%	0.6%	2.1%	1.2%	0.6%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_52_Q	JF826966.1	99%
								Thiobacillus aquaesulis strain ATCC 43788	NR_044793.1	91%
OTU83	Basteroidatas any OBS 17	0.2%	1.0%	1.3%	1.9%	1.1%	0.7%	hot spring unidentified Cytophagales OPB73	AF027008.1	100%
	Bacteroldetes, env. OF 5 17	0.270						Mucilaginibacter oryzae strain B9	NR_044404.1	82%
OTU10	Chloroflexi, Chloroflexus	0.1%	1.1%	1.0%	2.1%	1.1%	0.8%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01	AB685439.1	100%
								Chloroflexus aggregans DSM 9485	CP001337.1	99%
OTU67	Deinococcus-Thermus, Thermus	1 004	0.7%	0.8%	0.9%	1.1%	0.5%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_58_047	JF826980.1	100%
		1.970					0.570	Thermus arciformis strain TH92	NR_116251.1	99%
OTU64	Caldiserica, Caldisericum	0.0%	2.8%	0.7%	0.1%	0.9%	1.3%	Caldisericum exile AZM16c01	AP012051.1	99%
OTU45	Thermodesulfobacteria, Caldimicrobium	1.2%	0.6%	0.8%	0.6%	0.8%	0.2%	Caldimicrobium thiodismutans	AP014945.1	100%
OTU33	Deinococcus-Thermus, Meiothermus	0.0%	2.6%	0.2%	0.4%	0.8%	1.2%	Meiothermus hypogaeus strain AZM34c11	NR_113226.1	100%
OTU125		2.1%	0.3%	0.3%	0.2%	0.70/	0.00/	hot spring uncultured bacterium clone kua138	HM150304.1	97%
010123	Aquincae, mermocrims					0.7%	0.9%	Hydrogenobacter hydrogenophilus strain DSM 2913	NR_117617.1	97%
OTU352	Proteobacteria, Tepidimonas	0.1%	0.1%	0.3%	2.1%	0.6%	1.0%	Tepidimonas ignava strain SPS-1037	NR_025041.1	99%
OTU46	Proteobacteria, Thiobacter	0.6%	0.8%	0.3%	0.6%	0.6%	0.2%	Thiobacter subterraneus strain C55	NR_024834.1	100%

第4章:

総合討論

4.1 結果のまとめ

本研究では微生物共生系制御の要素技術として、まずは微生物共生系制御シ ステムを構築し、単一種集団の細胞内状態を光入力と測定値のフィードバック により動的制御した。さらに、光入力で特定の微生物を活性化したときに、他 の共存する微生物にどのような影響を及ぼすか評価した。本研究における微生 物共生系制御に関する重要な点は、未知状況を含む微生物共生系に対応するた めに、光入力によるフィードバック制御の雛型を作ったことと、多種共生系に 対して特定の微生物を刺激したときの系全体への影響を評価し可制御性の目安 をつけられるようにしたことである。

第二章では、光応答の Cph8-OmpR システムを持たせた大腸菌集団に対して、 赤色光の ON/OFF でそのシステムの出力であるレポータータンパク質 GFP の 発現を調節し、GFP 濃度を目標値へ動的制御した。入力は減衰の影響が小さい パルス入力を光で実現した。大腸菌内の GFP 濃度を蛍光強度としてフローサイ トメータにより逐次的に計測し、その計測値と数理モデルによる予測値との誤 差からその当時の細胞内状態を非線形カルマンフィルタによって推測し、目標 値へ向けた最適な入力系列の計算を修正しながら動的制御を行った。フィード バックをしないオープンループ制御も行ったが、実験時間が長くなると数理モ デルと現実との差が大きくなり、フィードバック制御の有用さが単一集団の制 御でも現れた。この実験では GFP 濃度のみを出力としてフィードバックしてい るが、非線形カルマンフィルタや制御手法として用いたモデル予測制御には出 力の数に制約がないので、菌叢・転写物・代謝物といった情報もフィードバッ クに利用でき、微生物共生系制御の雛型になることを想定している。これによ り、ヒトが望まない状態に遷移してしまう微生物共生系をヒトが必要とする状 態に動的制御できるようになり、微生物共生系を扱ったシステムの最適化を達 成できる。

第三章では、天然の微生物多種共生系に対して、特定の光波長を照射することで個別の光合成細菌を活性化し、それによって微生物コミュニティの多様性や菌叢にどのような影響が出たのか評価した。この研究では大きな粘性を持つ 微生物マットで実験を行ったので、空間的な作用も重要な系となっている。多 様性に関しては光波長条件によって大きな差は出ず、むしろ温度条件によって 出ていた。この実験では 51–55℃ の温度条件で実験したが、温度が高くなれば 種の豊富さが減少するということを確認した。これは微生物共生系に大きな摂 動を与えたいときには温度を調節すれば良いことを示唆している。光波長によ る影響は、光合成細菌は対応する光条件でその相対量が大きく変わっているこ とから、その影響が表れていた。相対量が1%以上の主要な化学合成細菌に対し ては、光条件によってその相対量に変化が現れているものもいたが、微生物コ ミュニティのメンバーが変わるということはなく、光合成細菌とあまり相互作 用をしていない微生物に対しては影響が限定的であろうことが分かった。微生 物マット中のコミュニティメンバー全体に目を向けると、有機物やビタミンを 生産し他の従属栄養細菌に利用されていると報告されている *Thermosynechococcus* sp.の増加条件では多くの種(OTU)が微増したが、硫化物 酸化菌であり他の微生物と電子受容体の競合が予想される *Chloroflexus* や *Roseiflexus*の増加条件では多くの種(OTU)の減少が見られた。さらに、これら の光合成細菌の増減と相関を持つ化学合成細菌も確認された。特定の微生物を 活性化しても全ての微生物に影響を与えることはできず、その共生系の可制御 性を考慮することが必要となる。

4.2 考察

本研究で、微生物共生系を制御する目的で、そのために必要な要素技術、微 生物共生系制御のためのシステム構築と単一種集団でのその試験、そして多種 共生系に対して特定の微生物を活性化したときの可制御性を評価した。微生物 共生系を制御するにあたって必要となるのは、あとは共生系のモデルである。 モデルを使わない制御手法もあるが、微生物共生系は非線形性が強く、またサ ンプリングから測定結果が出るまでに時間がかかりモデルによる予測が効果的 なので、モデルを用いた制御手法が有用である。そこで、本セクションでは微 生物共生系のモデルについて議論し、次いで光受容微生物をマスター菌として 微生物共生系を制御することについて議論する。

4.2.1 微生物共生系のモデル

本研究で、微生物共生系を制御する雛型を提案し単一種集団でその試験を行った。さらに、微生物多種共生系において特定の微生物を活性化することで、 菌叢にどの程度の影響を及ぼすことができるのか、微生物共生系の可制御性の 評価を一例ではあるが行った。よって、微生物共生系の制御に向けての大きな 障壁は、共生系のモデルのみとなった。ここでは既存の共生系モデルやモデル 構築に役立つ技術を紹介するとともに、共生系制御に利用することの実現性に 関して考察する。紹介するモデルは、ロトカ・ヴォルテラ方程式、ゲノムスケ ール代謝モデルである。

これは Faust らによって提案されている手法であるが、ロトカ・ヴォルテラ方 程式のパラメータを求めるのに静的ネットワークを用いる方法がある(130)。ロ トカ・ヴォルテラ方程式のパラメータは微生物の成長速度と微生物間の相互作 用から成るが、それらのパラメータを静的ネットワークの回帰分析によって求 めるのである(131–134)。任意のサンプル群から種の共起ネットワークを構築す る方法は多くある(135–139)。このネットワークは静的なものではあるが、上述 の方法で動的モデルを作るのに役立てることができる。ロトカ・ヴォルテラ方 程式は微生物多種共生系の安定性解析にも使われており、種の数が十分に大き いときの微生物間相互作用の種類(相利関係、搾取関係、競争関係)の割合が 安定性に及ぼす影響などが研究されている(140–142)。しかし、ロトカ・ヴォル テラ方程式は成長速度や相互作用のパラメータと微生物量の積から成る線形、 もしくは線形に近いモデルであり、基本的には平衡点まわりでのみ有効である。 微生物の代謝の切り替えを表現するのは難しく制約はあるが、共生系の平衡点 まわりの制御には有用である。複数のロトカ・ヴォルテラ方程式を切り替える ことで、様々な平衡点には対応できるようにできるかもしれない。

複数の代謝を含めたモデルの構築として、CoBRA 法 (Constraint-based Reconstruction and Analysis) がある(143)。これは細胞内が定常状態であることを 仮定して代謝フラックスを線形代数で表現し、各反応速度の上限値など制約を 加えていって、実験結果とつじつまが合うという意味で最適なゲノムスケール 代謝モデルを構築する手法である。この手法の一番のネックはモデル構築の基 となる代謝データの取得やそもそもの代謝系の情報取得に多大な労力がかかる ことである。それでも物質生産に有用な微生物を中心に、このゲノムスケール 代謝モデルは蓄積されつつある。微生物共生系においてもこのゲノムスケール 代謝モデルは使われつつある。共生系を相手にする場合、物質を細胞内へ取り 込む・細胞外へ排出する反応を代謝モデルに加えればよいだけであるが、その パラメータ同定での最適化で、それぞれの種への最適化に重きをおくか、共生 系としての最適化に重きをおくかでトレードオフが生じる問題がある。 Zomorrodi らはこの問題に対して、まずは個の最適化を行い、次いで共生系とし ての最適化を行うことで共生系のパラメータ同定に成功している(144)。そして、 この手法を用いて、メタン菌とバクテリアの2種共生系や、ヒト腸内に生息す る微生物3種共生系のモデル化に成功し、これらのモデルは実験結果を良く表 していた(145,146)。このモデルは未培養の微生物では扱えないなど欠点もあるが、 ロトカ・ヴォルテラ方程式含め、適応制御のようにパラメータを稼働中に微修 正していくなど制御手法の工夫でも制御性能を向上させることができ、微生物

共生系の制御に使用するモデルに十分に成りうるものである。

4.2.2 光受容微生物をマスター菌とした微生物共生系の制御

第二章で開発した制御システムの雛型を利用することで、光受容微生物の成 長や代謝活性の動的制御ができる。そして、光受容微生物をマスター菌とする ことで、第三章で示したように、他の微生物の成長や代謝活性をも制御するこ とができる。微生物共生系はこの後の展望で述べるように物質生産・処理で役 立てられることが期待できるが、ここでは光受容微生物をマスター菌として用 いることについて考察する。

光受容微生物の中でもシアノバクテリアは物質生産への応用でも開発・実用 化が進められている。シアノバクテリアは炭素や窒素の固定ができる能力のた め環境問題の観点から注力されているだけでなく、植物と比べ培養の簡易性、 速い成長速度、代謝系が良く理解されていること、そして遺伝子組み換え技術 が整備されている点でも注目されている。特に遺伝子組み換え技術が整備され ていることはシアノバクテリアの機能の拡充にとって重要で、従来の代謝工学 の手法として遺伝子の欠損や変異導入を施して代謝経路の最適化を図るだけで なく、外来の遺伝子導入によってバイオ燃料を生産する機能や(147,148)、物質生 産に有用な機能、例えばアンチセンス RNA を導入することによって誘導剤によ る遺伝子発現活性化の効果時間を長引かせるという機能(149)、が開発されてい る。合成生物学の分野では微生物の拡張機能が開発されていて、細胞間シグナ ルを用いて微生物間相互作用を人工的に作った多くの研究(150-152)はマスター 菌が他の微生物に相互作用を及ぼす仕組みに大いに役立つであろう。

さらに、光受容機能が開発されていて、大腸菌や酵母を光受容微生物に改変 することには成功している。これらは光を生存のためのエネルギーに変換する ことはまだできてはいないが、膜タンパク質が光を吸光し内部のタンパク質を リン酸化し遺伝子発現を調節するということは可能となっている(38,40)。シアノ バクテリアや合成生物学的に作られた光受容微生物のほかに、第三章で取り扱 ったような天然の非モデル光合成細菌をマスター菌として利用できるように特 性を実験で調査することも重要となる。酸素発生型光合成細菌のシアノバクテ リアと酸素非発生型光合成細菌である緑色光合成細菌は第三章でも紹介したよ うに他の微生物との関わりが全く異なり、取り扱う共生系の多様性を広げるこ とができる。第三章で評価した光合成細菌による共生系コミュニティの可制御 性に関しては、光入力では制御しにくい微生物は多く存在したが、これは周囲 の温泉やもともとの微生物マットに栄養が豊富にあったことにも由来している
と考えられ、環境中の栄養状態を制限することができれば共生系の可制御性は 向上することが期待できる。既存の光合成細菌はその存在自体が物質生産にと っては有能であり、さらにはマスター菌として微生物共生系の制御にも役立ち うること、そのうえ合成生物学で開発された機能を付随できればその自由度は 高まるであろう。

4.3 展望:微生物共生系制御の物質生産・処理への応用

微生物共生系の制御は物質生産・処理で役立てられることを展望として述べ る。微生物共生系は現在、メタン菌と関連微生物によるメタンガス生成リアク ターや、活性汚泥による汚水処理、そして伝統的な日本酒醸造など幅広い場所 で利用されている。このような微生物を利用したシステムは化学システムと比 較して、微生物に必要な栄養さえ与えていれば反応を自律的に起こしてくれる 材料面、また省エネルギーといった環境面から優れている(4)。このような制約 が効いてくる環境、例えば宇宙空間での居住では微生物による物質生産・処理 が期待されている(15)。メタン菌と関連微生物によるメタンガス生成リアクター では硫化水素が発生し、それが過剰になればメタン菌に悪影響になるうえ(153)、 メタンガスを利用するにあたっても硫化水素を排除しなければならない問題が ある(Fig 4-1)。この問題は緑色光合成細菌によって解決し得る。第三章で扱っ た Chloroflexus や Roseiflexus も属する緑色光合成細菌の一部は湖などでメタン菌 と絶対嫌気環境で共生しており(154)、酸素非発生型光合成で硫化水素を酸化し 消費することができる。実際に養殖場の底にたまった硫化水素を処理するのに 光合成細菌が使われている(155)。一方でアセテートなど有機物の利用において メタン菌と一部の酸素非発生型光合成細菌は競合しており、メタン菌は有機物 分解効率が良くないことからメタン菌は競争で負けてしまうという問題もある (78,79,86,156)。このように酸素非発生型光合成細菌を導入しないと硫化水素によ ってメタンガス合成効率が下がり、酸素発生型光合成細菌を導入すると硫化水 素は処理できるが光合成細菌の増加によってメタンガス合成効率が下がるとい う、トレードオフが発生する共生系となっている。このようなトレードオフが 発生する共生系において第二章で構築した制御システムは効果を発揮し、第三 章で活性化とその可制御性の評価に成功した酸素非発生型光合成細菌の代謝系 を動的制御し利益を最大化 (この系ではメタンガス合成効率の最大化) できる。 宇宙空間のような環境ではお酒のような娯楽も必要である。伝統的な日本酒醸 造ではコウジカビが米のデンプンを分解しグルコースにし、酵母がグルコース からエタノールを、乳酸菌はグルコースから乳酸を作ることにより酸性環境に し雑菌が侵入することを防いでいる。遺伝子組み換えシアノバクテリアによっ

てバイオ燃料を作る要領でお酒を造ることも可能ではあるが、遺伝子組み換え をしない場合でもシアノバクテリアのバイオマスを酵母や乳酸菌が利用し日本 酒を作ることは可能である。この場合、シアノバクテリアがシステムの上流に 位置し、シアノバクテリアが光合成によって合成する糖を下流の酵母や乳酸菌 が使うことになるので、光入力によってアルコール度数や酸味を調節できるこ とが考えられる。最後に活性汚泥による排水処理についてであるが、活性汚泥 は好気環境にさらされることが多く、さらに光が届きにくいため光合成細菌は 紅色非硫黄細菌を除いてあまり観測されない。紅色非硫黄細菌はほとんどが通 性嫌気で、光従属栄養的に生息している。この紅色非硫黄細菌は高濃度有機性 排水 (BOD 値 >1000ppm) で良く増殖し、その有機物を分解している(157)。さ らに硫化水素の処理で光合成細菌は役立ち得る。しかし、微生物にとっては高 濃度の栄養が常に流れてくる環境では光合成細菌の影響はとても小さく、光合 成細菌を通しての微生物共生系制御は無理である。ただし、第三章で入力に対 する応答を菌叢で計測したが、菌叢情報をフィードバックするというのは活性 汚泥の制御にとって有用であると考えられる。現在の東京都の下水処理は放流 する際に有機物 (BOD、COD) や浮遊物質 (SS) それに pH や溶存酸素を測る ことで水質を検査し、その情報をもとに経験的に返送汚泥の量と送入空気量を 調節するのみである。安定した気候、安定した排水が送られる下水処理場であ ればそれで問題ないが、そうではない下水処理場は多い。そういった場所含め、 これからは菌叢と環境因子を測定し、モデルでシミュレーションした上でその 状況に見合った微生物製剤を必要最小限投与することも微生物共生系制御の仕 事として求められていくであろう。本研究で構築した微生物共生系の制御シス テムと、個別の光合成細菌活性化とその活性化が他細菌へ与える影響の評価結 果は、光合成細菌を介して微生物共生系を制御し、トレードオフが発生してい るシステムの効率を最適化するのに役立つであろう。



Figure 4-1 メタンガス生成する微生物共生系

(a) メタン発酵菌群がメタンガスを生成するが、同時に発生する硫化水素がメ タン菌の成長を阻害する。酸素非発生型光合成細菌は光合成反応で硫化水素を 消費し、有機物をメタン菌よりも優位に消費する。(b) メタン発酵菌群、酸素 非発生型光合成細菌、硫化水素の動的挙動の概念図。(b 左) 光合成細菌がいな ければ硫化水素が増え、メタン菌の成長が阻害される。(b 左) 光合成細菌を 系に投入し動的制御せず恒常的に光照射し続ければ、成長が遅いメタン菌は光 合成細菌に栄養を奪われることで成長が阻害される。(b 右) 光合成細菌の光栄 養成長を動的に制御することで、メタン菌の増殖を最大化することができ、メ タンガスの生成効率が向上する。

公表論文

学術論文

Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity, Akifumi Nishida, Vera Thiel, Mayuko Nakagawa, Shotaro Ayukawa, Masayuki Yamamura (PLoS One, 2018 13(1): e0191650) (論文・査読有)

国際学会(口頭発表)

High-frequency noise attenuation of a two-component system responding to short-pulse input, Akifumi Nishida, Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, and Masayuki Yamamura, Proc. of The 7th international conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics (CSBio2016), pp. 28-35, Macao, December, 2016(論文・査読有)

国内学会(ポスター)

人工ファージによる活性汚泥中の微生物共生系解析,西田暁史,中川麻悠子, 鮎川翔太郎,山村雅幸,第1回日本共生生物学会,筑波,2017年

硫黄サイクルに関わる微生物共生系の再構成に向けたシミュレーション,西田 暁史,山村雅幸,第2回デザイン生命工学研究会,神戸,2017年

光波長による微生物マットの制御,西田暁史,中川麻悠子,鮎川翔太郎,山村 雅幸,「細胞を創る」研究会 9.0,東京,2016 年

光波長制御による微生物マット相互作用の解明,西田暁史,中川麻悠子,鮎川 翔太郎,山村雅幸,日本微生物生態学会 第31回大会,横須賀,2016年

短パルス応答性を持つ Two-component system から生じる高周波ノイズとその減 衰,西田暁史,関根亮二,木賀大介,山村雅幸,生命動態の分子メカニズムと 数理,京都,2015 年

共生系への合成生物学的アプローチ,西田暁史,鮎川翔太朗,山村雅幸,環境 微生物系学会合同大会 2014,浜松,2014 年

Dynamical control of protein concentration using synthetic two-component system, Akifumi Nishida, Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, and Masayuki Yamamura, CBI 学会 2013 年大会, 東京, 2013 年

参考文献

- 1. DeLong EF. The microbial ocean from genomes to biomes. Nature. 2009 14;459(7244):200–6.
- Gougoulias C, Clark JM, Shaw LJ. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. J Sci Food Agric. 2014;94(12):2362–71.
- 3. Gilbert JA, Neufeld JD. Life in a World without Microbes. PLoS Biol. 2014;12(12):e1002020.
- 4. Benz GT. Bioreactor Design for Chemical Engineers. Am Inst Chem Eng. 2011;(August):21–6.
- 5. Zhang F, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. Nat Biotechnol. 2012;30(4):354–9.
- Bothfeld W, Kapov G, Tyo KEJ. A Glucose-Sensing Toggle Switch for Autonomous, High Productivity Genetic Control. ACS Synth Biol. 2017;6(7):1296–304.
- 7. Soma Y, Hanai T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production. Metab Eng. 2015;30:7–15.
- Gupta A, Reizman IMB, Reisch CR, Prather KLJ. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. Nat Biotechnol. 2017;35(3):273–9.
- 9. Hennig S, Rödel G, Ostermann K. Artificial cell-cell communication as an emerging tool in synthetic biology applications. J Biol Eng. 2015;9(1):13.
- Chuang JS. Engineering multicellular traits in synthetic microbial populations. Curr Opin Chem Biol. 2012;16(3–4):370–8.
- Wang B, Kitney RI, Joly N, Buck M. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology. Nat Commun. 2011;2(1):508.
- Moon TS, Lou C, Tamsir A, Stanton BC, Voigt CA. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. Nature. 2012;491(7423):249– 53.
- Tamsir A, Tabor JJ, Voigt CA. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical "wires". Nature. 2011;469(7329):212–5.
- 14. Regot S, Macia J, Conde N, Furukawa K, Kjellén J, Peeters T, et al. Distributed

biological computation with multicellular engineered networks. Nature. 2011;469(7329):207–11.

- Cottin H, Kotler JM, Billi D, Cockell C, Demets R, Ehrenfreund P, et al. Space as a Tool for Astrobiology: Review and Recommendations for Experimentations in Earth Orbit and Beyond. Space Sci Rev. 2017;209(1–4):83–181.
- 16. Hekstra DR, Leibler S. Contingency and statistical laws in replicate microbial closed ecosystems. Cell. 2012;149(5):1164–73.
- Benincà E, Huisman J, Heerkloss R, Jöhnk KD, Branco P, Van Nes EH, et al. Chaos in a long-term experiment with a plankton community. Nature. 2008;451(7180):822–5.
- 18. Vannette RL, Fukami T. Historical contingency in species interactions: towards niche-based predictions. Ecol Lett. 2014;17(1):115–24.
- 19. Swain PS. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. 2002;297:1183–7.
- 20. Kærn M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. Nat Rev Genet. 2005;6(6):451–64.
- Olson EJ, Hartsough LA, Landry BP, Shroff R, Tabor JJ. Characterizing bacterial gene circuit dynamics with optically programmed gene expression signals. Nat Methods. 2014;11(4):449–55.
- 22. Davidson EA, Basu AS, Bayer TS. Programming microbes using pulse width modulation of optical signals. J Mol Biol. 2013;425(22):4161–6.
- 23. Menolascina F, di Bernardo M, di Bernardo D. Analysis, design and implementation of a novel scheme for in-vivo control of synthetic gene regulatory networks. Automatica. 2011;47(6):1265–70.
- Uhlendorf J, Miermont A, Delaveau T, Charvin G, Fages F, Bottani S, et al. Long-term model predictive control of gene expression at the population and single-cell levels. Proc Natl Acad Sci. 2012;109(35):14271–6.
- Menolascina F, Fiore G, Orabona E, De Stefano L, Ferry M, Hasty J, et al. In-Vivo Real-Time Control of Protein Expression from Endogenous and Synthetic Gene Networks. Gabhann F Mac, editor. PLoS Comput Biol. 2014;10(5):e1003625.
- Milias-Argeitis A, Summers S, Stewart-Ornstein J, Zuleta I, Pincus D, El-Samad H, et al. In silico feedback for in vivo regulation of a gene expression circuit. Nat Biotechnol. 2011;29(12):1114–6.
- 27. Toettcher JE, Gong D, Lim WA, Weiner OD. Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics. Nat Methods. 2011;8(10):837–9.
- 28. Howell AS, Savage NS, Johnson SA, Bose I, Wagner AW, Zyla TR, et al.

Singularity in Polarization: Rewiring Yeast Cells to Make Two Buds. Cell. 2009;139(4):731–43.

- 29. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R. Accelerating the Tempo of the Segmentation Clock by Reducing the Number of Introns in the Hes7 Gene. Cell Rep. 2013;3(1):1–7.
- Bashor CJ, Horwitz AA, Peisajovich SG, Lim WA. Rewiring Cells: Synthetic Biology as a Tool to Interrogate the Organizational Principles of Living Systems. Annu Rev Biophys. 2010;39(1):515–37.
- 31. Chen YY, Galloway KE, Smolke CD. Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. Genome Biol. 2012;13(2):240.
- Lim WA. Designing customized cell signalling circuits. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(6):393–403.
- Riccione KA, Smith RP, Lee AJ, You L. A Synthetic Biology Approach to Understanding Cellular Information Processing. ACS Synth Biol. 2012;1(9):389– 402.
- Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr Opin Microbiol. 2000;3(2):165–70.
- 35. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 2000;69:183–215.
- Ninfa AJ, Selinsky S, Perry N, Atkins S, Xiu Song Q, Mayo A, et al. Using Two - Component Systems and Other Bacterial Regulatory Factors for the Fabrication of Synthetic Genetic Devices. In: Methods in Enzymology. 2007;488–512.
- Whitaker WR, Davis SA, Arkin AP, Dueber JE. Engineering robust control of two-component system phosphotransfer using modular scaffolds. Proc Natl Acad Sci. 2012;109(44):18090–5.
- 38. Schmidt D, Cho YK. Natural photoreceptors and their application to synthetic biology. Trends Biotechnol. 2015;33(2):80–91.
- 39. Kim B, Lin MZ. Optobiology: optical control of biological processes via protein engineering. Biochem Soc Trans. 2013;41(5):1183–8.
- 40. Levskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, Simpson ZB, Lavery LA, Levy M, et al. Engineering Escherichia coli to see light. Nature. 2005;438(7067):441–2.
- 41. Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. Science. 1997;277(5331):1505–8.
- 42. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio

collection. Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0008.

- 43. Tabor JJ, Salis HM, Simpson ZB, Chevalier AA, Levskaya A, Marcotte EM, et al. A synthetic genetic edge detection program. Cell. 2009;137(7):1272–81.
- 44. Lefebvre T, Bruyninckx H, De Schuller J. A new method for the nonlinear transformation of means and covariances in filters and estimators. IEEE Trans Automat Contr. 2002;47(8):1406–9.
- 45. Sekine R, Yamamura M, Ayukawa S, Ishimatsu K, Akama S, Takinoue M, et al. Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling. Proc Natl Acad Sci. 2011;108(44):17969–73.
- 46. Elowitz MB, Leibier S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature. 2000;403(6767):335–8.
- 47. Tsutsui S, Yamamura M, Higuchi T. Multi-parent recombination with simplex crossover in real coded genetic algorithms. Proc 1999 Genet Evol Comput Conf. 1999;657–64.
- 48. Satoh H, Yamamura M, Kobayashi S. Generating parent optimal decision trees by GAs. Proc IIZUKA'96. 1996;854–8.
- 49. Chang Y-C, Armitage JP, Papachristodoulou A, Wadhams GH. A single phosphatase can convert a robust step response into a graded, tunable or adaptive response. Microbiology. 2013;159(Pt 7):1276–85.
- Igoshin OA, Alves R, Savageau MA. Hysteretic and graded responses in bacterial two-component signal transduction. Mol Microbiol. 2008;68(5):1196– 215.
- 51. Dasgupta J, Frontiera RR, Taylor KC, Lagarias JC, Mathies RA. Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy. Proc Natl Acad Sci. 2009;106(6):1784–9.
- 52. Crozat E, Hindre T, Kuhn L, Garin J, Lenski RE, Schneider D. Altered Regulation of the OmpF Porin by Fis in Escherichia coli during an Evolution Experiment and between B and K-12 Strains. J Bacteriol. 2011;193(2):429–40.
- Darcan C. Expression of OmpC and OmpF porin proteins and survival of Escherichia coli under photooxidative stress in Black Sea water. Aquat Biol. 2012;17(2):97–105.
- 54. Heyes DJ, Khara B, Sakuma M, Hardman SJO, O'Cualain R, Rigby SEJ, et al. Ultrafast Red Light Activation of Synechocystis Phytochrome Cph1 Triggers Major Structural Change to Form the Pfr Signalling-Competent State. Wu M, editor. PLoS One. 2012;7(12):e52418.
- 55. Taniguchi Y, Choi PJ, Li G-W, Chen H, Babu M, Hearn J, et al. Quantifying E.

coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. Science. 2010;329(5991):533–8.

- Alon U. An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits. Vol. 10, Chapman HallCRC mathematical and computational biology series. 2007.
- 57. Bernstein JA, Khodursky AB, Lin P-H, Lin-Chao S, Cohen SN. Global analysis of mRNA decay and abundance in Escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. Proc Natl Acad Sci. 2002;99(15):9697–702.
- 58. Pande S, Kost C. Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. Trends Microbiol. 2017;25(5):349–61.
- 59. Franks J, Stolz JF. Flat laminated microbial mat communities. Earth-Science Rev. 2009;96(3):163–72.
- 60. Hanada S. Filamentous Anoxygenic Phototrophs in Hot Springs. Microbes Environ. 2003;18(2):51–61.
- Ward DM, Ferris MJ, Nold SC, Bateson MM. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(4):1353–70.
- Kato K, Kobayashi T, Yamamoto H, Nakagawa T, Maki Y, Hoaki T. Microbial Mat Boundaries between Chemolithotrophs and Phototrophs in Geothermal Hot Spring Effluents. Geomicrobiol J. 2004;21(2):91–8.
- 63. Kubo K, Knittel K, Amann R, Fukui M, Matsuura K. Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. Syst Appl Microbiol. 2011;34(4):293–302.
- 64. Nakagawa T, Fukui M. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. J Gen Appl Microbiol. 2002;48(4):211–22.
- 65. Otaki H, Everroad RC, Matsuura K, Haruta S. Production and Consumption of Hydrogen in Hot Spring Microbial Mats Dominated by a Filamentous Anoxygenic Photosynthetic Bacterium. Microbes Environ. 2012;27(3):293–9.
- 66. Fogg GE. The Ecological Significance of Extracellular Products of Phytoplankton Photosynthesis. Bot Mar. 1983;26(1):3–14.
- 67. Bertilsson S, Berglund O, Pullin MJ, Chisholm SW. Release of dissolved organic matter by Prochlorococcus. Vie Milieu. 2005;55(3–4):225–31.
- 68. Stuart RK, Mayali X, Lee JZ, Craig Everroad R, Hwang M, Bebout BM, et al. Cyanobacterial reuse of extracellular organic carbon in microbial mats. ISME J.

2016;10:1240-51.

- Bernstein HC, McClure RS, Thiel V, Sadler NC, Kim Y-M, Chrisler WB, et al. Indirect Interspecies Regulation: Transcriptional and Physiological Responses of a Cyanobacterium to Heterotrophic Partnership. mSystems. 2017;2(2).
- Madigan MT, Brock TD. Photosynthetic Sulfide Oxidation by Chloroflexus aurantiacus, a Filamentous, PhotosyntheticGliding Bacterium. J Bacteriol. 1975;122(2):782–4.
- Madigan M, Petersen S, Brock T. Nutritional studies on *Chloroflexus*, a filamentous photosynthetic, gliding bacterium. Arch Microbiol. 1974;100(1):97–103.
- 72. Klatt CG, Liu Z, Ludwig M, Kühl M, Jensen SI, Bryant DA, et al. Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic Chloroflexi inhabiting a microbial mat in a geothermal spring. ISME J. 2013;7(9):1775–89.
- 73. Kim Y-M, Nowack S, Olsen MT, Becraft ED, Wood JM, Thiel V, et al. Diel metabolomics analysis of a hot spring chlorophototrophic microbial mat leads to new hypotheses of community member metabolisms. Front Microbiol. 2015;6(209).
- 74. Bernstein HC, Charania MA, McClure RS, Sadler NC, Melnicki MR, Hill EA, et al. Multi-Omic Dynamics Associate Oxygenic Photosynthesis with Nitrogenase-Mediated H2 Production in Cyanothece sp. ATCC 51142. Sci Rep. 2015;5(16004).
- 75. Everroad CR, Otaki H, Matsuura K, Haruta S. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. Microbes Environ. 2012;27(4):374–81.
- 76. Ferris MJ, Kühl M, Wieland A, Ward DM. Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68°C hot spring mat community revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation. Appl Environ Microbiol. 2003;69(5):2893–8.
- Pierson BK, Castenholz RW. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, Chloroflexus aurantiacus, gen. and sp. nov. Arch Microbiol. 1974;100(1):5–24.
- 78. Hanada S, Hiraishi A, Shimada K, Matsuura K. Chloroflexus aggregans sp. nov., a Filamentous Phototrophic Bacterium Which Forms Dense Cell Aggregates by Active Gliding Movement. Int J Syst Bacteriol. 1995;45(4):676–81.
- 79. Hanada S, Takaichi S, Matsuura K, Nakamura K. Roseiflexus castenholzii gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks

chlorosomes. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52(1):187–93.

- Madigan MT, Jung DO, Karr EA, Sattley WM, Achenbach LA, van der Meer MTJ. Diversity of Anoxygenic Phototrophs in Contrasting Extreme Environments. Geotherm Biol Geochemistry YNP. 2005;1:203–20.
- 81. Holo H, Sirevag R. Autotrophic growth and CO2 fixation of Chloroflexus aurantiacus. Arch Microbiol. 1986;145(2):173–80.
- Holo H. Chloroflexus aurantiacus secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO2 and acetate. Arch Microbiol. 1989;151(3):252–6.
- 83. Thiel V, Hamilton TL, Tomsho LP, Burhans R, Gay SE, Ramaley RF, et al. Draft Genome Sequence of the Moderately Thermophilic Bacterium Schleiferia thermophila Strain Yellowstone (Bacteroidetes). Genome Announc. 2014;2(4).
- 84. Van Der Meer MT, Schouten S, Bateson MM, Nübel U, Wieland A, Kühl M, et al. Diel variations in carbon metabolism by green nonsulfur-like bacteria in alkaline siliceous hot spring microbial mats from Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol. 2005;71(7):3978–86.
- 85. Klatt CG, Bryant DA, Ward DM. Comparative genomics provides evidence for the 3-hydroxypropionate autotrophic pathway in filamentous anoxygenic phototrophic bacteria and in hot spring microbial mats. Environ Microbiol. 2007;9(8):2067–78.
- 86. van der Meer MT, Klatt CG, Wood J, Bryant DA, Bateson MM, Lammerts L, et al. Cultivation and genomic, nutritional, and lipid biomarker characterization of Roseiflexus strains closely related to predominant in situ populations inhabiting yellowstone hot spring microbial mats. J Bacteriol. 2010;192(12):3033–42.
- 87. Kimura H, Mori K, Nashimoto H, Hattori S, Yamada K, Koba K, et al. Biomass production and energy source of thermophiles in a Japanese alkaline geothermal pool. Environ Microbiol. 2010;12(2):480–9.
- 88. Kimura H, Mori K, Nashimoto H, Hanada S, Kato K. In situ biomass production of a hot spring sulfur-turf microbial mat. Microbes Environ. 2010;25(2):140–3.
- Nakagawa T, Fukui M. Molecular characterization of community structures and sulfur metabolism within microbial streamers in Japanese hot springs. Appl Environ Microbiol. 2003;69(12):7044–57.
- 90. Nübel U, Bateson MM, Vandieken V, Wieland A, Kühl M, Ward DM. Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse Chloroflexaceae-related bacteria in hot spring microbial mats. Appl Environ Microbiol. 2002;68(9):4593–603.

- 91. Kirilovsky D, Roncel M, Boussac A, Wilson A, Zurita JL, Ducruet J-M, et al. Cytochrome c550 in the cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus: study of redox mutants. J Biol Chem. 2004;279(51):52869–80.
- 92. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 2013;41:590-6.
- 93. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics. 2011;27(6):863–4.
- 94. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 2012;9(4):357–9.
- 95. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal. 2011;17(1):10.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7(5):335–6.
- 97. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010;26(19):2460–1.
- 98. Thiel V, Wood JM, Olsen MT, Tank M, Klatt CG, Ward DM, et al. The Dark Side of the Mushroom Spring Microbial Mat: Life in the Shadow of Chlorophototrophs. I. Microbial Diversity Based on 16S rRNA Gene Amplicons and Metagenomic Sequencing. Front Microbiol. 2016;7.
- 99. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403–10.
- 100. Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar A, et al. ARB: A software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 2004;32(4):1363–71.
- 101. Bachar A, Polerecky L, Fischer JP, Vamvakopoulos K, De Beer D, Jonkers HM. Two-dimensional mapping of photopigment distribution and activity of Chloroflexus-like bacteria in a hypersaline microbial mat. FEMS Microbiol Ecol. 2008;65(3):434–48.
- Bolhuis H, Cretoiu MS, Stal LJ. Molecular ecology of microbial mats. FEMS Microbiol Ecol. 2014;90(2):335–50.
- 103. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates. Environ Microbiol. 2006;8(11):1997–2011.
- 104. Zhao C, Li Z, Li T, Zhang Y, Bryant DA, Zhao J. High-yield production of

extracellular type-I cellulose by the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Cell Discov. 2015;1.

- 105. Wong MT, Wang W, Lacourt M, Couturier M, Edwards EA, Master ER. Substrate-driven convergence of the microbial community in lignocellulose-amended enrichments of gut microflora from the Canadian beaver (Castor canadensis) and North American moose (Alces americanus). Front Microbiol. 2016;7.
- Schwarz WH. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Vol. 56, Applied Microbiology and Biotechnology. 2001;634–49.
- 107. Albuquerque L, Rainey FA, Nobre MF, da Costa MS. Elioraea tepidiphila gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic member of the Alphaproteobacteria. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58(4):773–8.
- Riordan C. Spectral solar radiation data and measurements. Sol Cells. 1988;24(3– 4):313–20.
- 109. Liu Z, Klatt CG, Wood JM, Rusch DB, Ludwig M, Wittekindt N, et al. Metatranscriptomic analyses of chlorophototrophs of a hot-spring microbial mat. ISME J. 2011;5(8):1279–90.
- 110. Liu Z, Klatt CG, Ludwig M, Rusch DB, Jensen SI, Kühl M, et al. "Candidatus Thermochlorobacter aerophilum:" an aerobic chlorophotoheterotrophic member of the phylum Chlorobi defined by metagenomics and metatranscriptomics. ISME J. 2012;6(10):1869–82.
- 111. Boomer SM, Lodge DP, Dutton BE, Pierson B. Molecular characterization of novel red green nonsulfur bacteria from five distinct hot spring communities in Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol. 2002;68(1):346–55.
- 112. Podosokorskaya OA, Merkel YA, Kolganova T V., Chernyh NA, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, et al. Fervidobacterium riparium sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61(11):2697–701.
- 113. Thiel V, Hügler M, Ward DM, Bryant DA. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of chlorophototrophs. II. Metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses. Front Microbiol. 2017;
- 114. Tank M, Thiel V, Ward DM, Bryant DA. A panoply of phototrophs: a photomicrographic overview of the thermophilic chlorophototrophs of the microbial mats of alkaline siliceous hots springs in Yellowstone National Park, WY, USA. In: Hallenbeck PC, editor. in Modern Topics in the Phototrophic

Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects. Springer; 2017;87–137.

- 115. Tank M, Bryant DA. Chloracidobacterium thermophilum gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(5):1426–30.
- 116. Imachi H, Sakai S, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Takai K, et al. Exilispira thermophila gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic spirochaete isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58(10):2258–65.
- Beeder J, Torsvik T, Lien T. Thermodesulforhabdus norvegicus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. Arch Microbiol. 1995;164(5):331–6.
- 118. Sievert SM, Kuever J. Desulfacinum hydrothermale sp. nov., a thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(3):1239–46.
- 119. Allewalt JP, Bateson MM, Revsbech NP, Slack K, Ward DM. Effect of Temperature and Light on Growth of and Photosynthesis by Synechococcus Isolates Typical of Those Predominating in the Octopus Spring Microbial Mat Community of Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol. 2006;72(1):544–50.
- 120. Hays SG, Yan LLW, Silver PA, Ducat DC. Synthetic Photosynthetic Consortia Define Interactions Leading to Robustness and Photoproduction. J Biol Eng. 2017;11(4).
- 121. Bryant DA, Liu Z, Li T, Zhao F, Garcia Costas AM, Klatt CG, et al. Comparative and functional genomics of anoxygenic green bacteria from the taxa Chlorobi, Chloroflexi, and Acidobacteria. In: Functional Genomics and Evolution of Photosynthetic Systems. 2012;47–102.
- 122. Hirayama H, Takai K, Inagaki F, Nealson KH, Horikoshi K. Thiobacter subterraneus gen. nov., sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(1):467–72.
- 123. Kojima H, Umezawa K, Fukui M. Caldimicrobium thiodismutans sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus Caldimicrobium. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(4):1828–31.
- 124. Jensen SI, Steunou A-S, Bhaya D, Kühl M, Grossman AR. In situ dynamics of O2, pH and cyanobacterial transcripts associated with CCM, photosynthesis and

detoxification of ROS. ISME J. 2011;5(2):317–28.

- 125. Becraft ED, Cohan FM, Kühl M, Jensen SI, Ward DM. Fine-scale distribution patterns of Synechococcus ecological diversity in microbial mats of mushroom spring, Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol. 2011;77(21):7689– 97.
- 126. Albuquerque L, Tiago I, Veríssimo A, da Costa MS. Tepidimonas thermarum sp. nov., a new slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from the Elisenquelle in Aachen and emended description of the genus Tepidimonas. Syst Appl Microbiol. 2006;29(6):450–6.
- 127. Hayashi NR, Ishida T, Yokota A, Kodama T, Igarashi Y. Hydrogenophilus thermoluteolus gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:783–6.
- 128. Zhang XQ, Ying Y, Ye Y, Xu XW, Zhu XF, Wu M. Thermus arciformis sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(4):834–9.
- 129. Dong L, Ming H, Yin Y-R, Duan Y-Y, Zhou E-M, Nie G-X, et al. Roseomonas alkaliterrae sp. nov., isolated from an alkali geothermal soil sample in Tengchong, Yunnan, South-West China. Antonie Van Leeuwenhoek. 2014;105(5):899–905.
- Faust K, Lahti L, Gonze D, de Vos WM, Raes J. Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. Curr Opin Microbiol. 2015;25:56–66.
- 131. Stein RR, Bucci V, Toussaint NC, Buffie CG, Rätsch G, Pamer EG, et al. Ecological modeling from time-series inference: insight into dynamics and stability of intestinal microbiota. PLoS Comput Biol. 2013;9(12):e1003388.
- 132. Fisher CK, Mehta P. Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic timeseries using sparse linear regression. PLoS One. 2014;9(7):e102451.
- 133. Marino S, Baxter NT, Huffnagle GB, Petrosino JF, Schloss PD. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(1):439–44.
- 134. Mounier J, Monnet C, Vallaeys T, Arditi R, Sarthou A-S, Hélias A, et al. Microbial interactions within a cheese microbial community. Appl Environ Microbiol. 2008;74(1):172–81.
- 135. Chaffron S, Rehrauer H, Pernthaler J, von Mering C. A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data.

Genome Res. 2010;20(7):947–59.

- 136. van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JWA, de Steenhuijsen Piters WAA, Bosch AATM, van Gils EJM, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. PLoS One. 2012;7(10):e47711.
- 137. Friedman J, Alm EJ. Inferring correlation networks from genomic survey data. PLoS Comput Biol. 2012;8(9):e1002687.
- 138. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. PLoS Comput Biol. 2012;8(7):e1002606.
- Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. ISME J. 2012;6(2):343–51.
- 140. May RM. Will a large complex system be stable? Nature. 1972;238(5364):413–4.
- 141. Allesina S, Tang S. Stability criteria for complex ecosystems. Nature. 2012;483(7388):205–8.
- 142. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. Science. 2015;350(6261):663–6.
- 143. Lewis NE, Nagarajan H, Palsson BO. Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. Nat Rev Microbiol. 2012;10(4):291–305.
- Zomorrodi AR, Maranas CD. OptCom: a multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities. PLoS Comput Biol. 2012;8(2):e1002363.
- 145. Shoaie S, Karlsson F, Mardinoglu A, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. Sci Rep. 2013;3:2532.
- 146. Stolyar S, Van Dien S, Hillesland KL, Pinel N, Lie TJ, Leigh JA, et al. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. Mol Syst Biol. 2007;3(92):92.
- McEwen JT, Atsumi S. Alternative biofuel production in non-natural hosts. Curr Opin Biotechnol. 2012;23(5):744–50.
- Zhang F, Rodriguez S, Keasling JD. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. Curr Opin Biotechnol. 2011;22(6):775–83.
- 149. Higo A, Isu A, Fukaya Y, Hisabori T. Designing Synthetic Flexible Gene Regulation Networks Using RNA Devices in Cyanobacteria. ACS Synth Biol.

2017;6(1):55-61.

- 150. Brenner K, You L, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends Biotechnol. 2008;26(9):483–9.
- 151. Macia J, Sole R. How to make a synthetic multicellular computer. PLoS One. 2014;9(2):e81248.
- 152. Momeni B, Chen C-C, Hillesland KL, Waite A, Shou W. Using artificial systems to explore the ecology and evolution of symbioses. Cell Mol Life Sci. 2011;68(8):1353–68.
- 153. Karhadkar PP, Audic J-M, Faup GM, Khanna P. Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. Water Res. 1987;21(9):1061–6.
- 154. Nakagawa M, Ueno Y, Hattori S, Umemura M, Yagi A, Takai K, et al. Seasonal change in microbial sulfur cycling in monomictic Lake Fukami-ike, Japan. Limnol Oceanogr. 2012;57(4):974–88.
- 155. Maki T. 光合成細菌利用技術 水処理および多目的な利用技術の構築.環 境技術. 2002;31(4):41-7.
- 156. Jetten MSM, Stams AJM, Zehnder AJB. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in Methanothrix soehngenii and Methanosarcina spp. FEMS Microbiol Lett. 1992;88(3–4):181–98.
- 157. Kato A, Kita D, Kubotera T, Tsuji H. 微生物による有機系排水処理と余剰微
 生物の資源下に関する研究.
 https://www.obayashi.co.jp/technology/shoho/048/1994_048_27.pdf

謝辞

本研究は山村雅幸教授のご指導と励ましのもとに行われました。山村先生が研 究の自由を与えてくれたからこそ研究の面白さを味わうことができました。心 から感謝いたします。

木賀大介教授には実験計画の指導だけでなく、文章の書き方など研究の基本的なことをご指導いただきました。誠にありがとうございました。

鮎川さんや関根さんには実験を指導していただきました。鮎川さんには微生物 共生系の研究をするきっかけをいただきましたし、中川さんはじめとしたヒト も紹介していただきました。お二人には大変感謝しております。

中川さんには微生物マットをはじめとした面白い現象をいくつも教えていただ きましたし、実験を多大にサポートしていただきました。心より感謝申し上げ ます。

Vera さんは大したつながりもないのに研究の協力をお願いしましたら快く受け 入れてくれ、多大なサポートをしていただきました。Besten Dank.

西さんや平野さん、畑さんに榎本さんには大いにサポートしていただき、それ だけにとどまらず、大いに笑わせていただきました。感謝申し上げます。

実験に必要な器具を作るために、瀧ノ上先生や伊藤さん、早川くんには装置を 使わせていただくとともに使い方のサポートをしていただきました。心より感 謝申し上げます。

笹川科学研究助成には研究費だけでなく、採択していただいたことにより本当 に励まされ最後まで研究を遂行することができました。心より感謝申し上げま す。

研究室内では小宮先生はじめ書ききれないくらい多くの方々にアドバイスやサ ポートをいただきました。感謝申し上げます。

感謝でゲシュタルト崩壊が起きていますが最後に、好き勝手させてくれた方々 に感謝申し上げます。