T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech 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)	西田暁史
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

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

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

第一章：微生物共生系制御について **5**

1.1　背景 5

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 6

1.1.3　微生物共生系の制御 7

1.2　研究目的と論文の構成 8

第二章：単一種の微生物集団の制御 **9**

2.1　導入 9

2.2　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　パ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 Algorithm 14

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 16

図表 18

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
公表論文 73
参考文献 74
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－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 P_r 状態に、赤色光下で P_{fr} 状態になる(41)。P_r 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/m^2 であり、Cph8 は 0.05 W/m^2 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

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

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

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

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

数理モデルを用いて制御するために、我々は 4 つの変数；P_r 状態の Cph8 の濃度、リン酸化された OmpR（R_p）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。P_{tot} と R_{tot} 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 v_1 と v_2、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 γ_m 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（60 s）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 1 s 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、P_r 状態と P_{fr} 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。この微生物共生系用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。

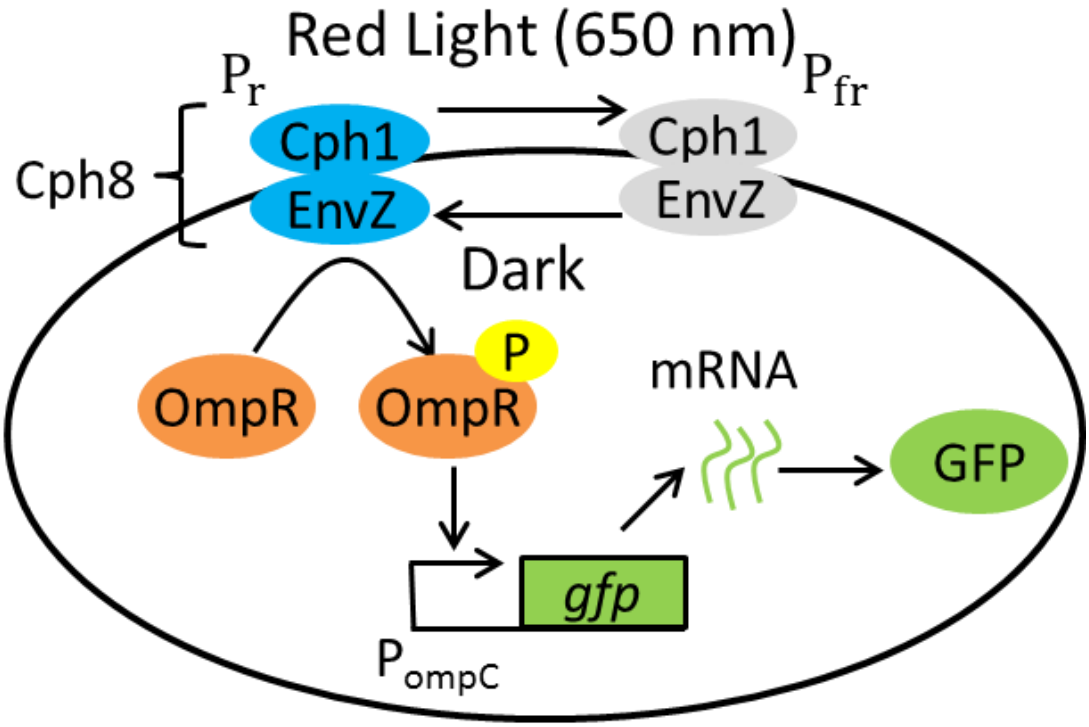


Figure 2-1　Cph8-OmpR システムの概念図

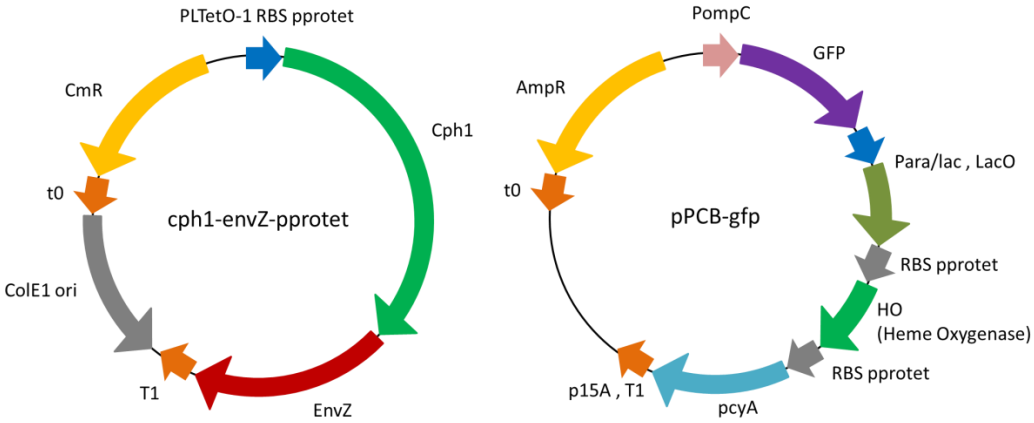


Figure 2-2　cph1-envZ-pprotet プラスミドと pPCB-gfp プラスミド

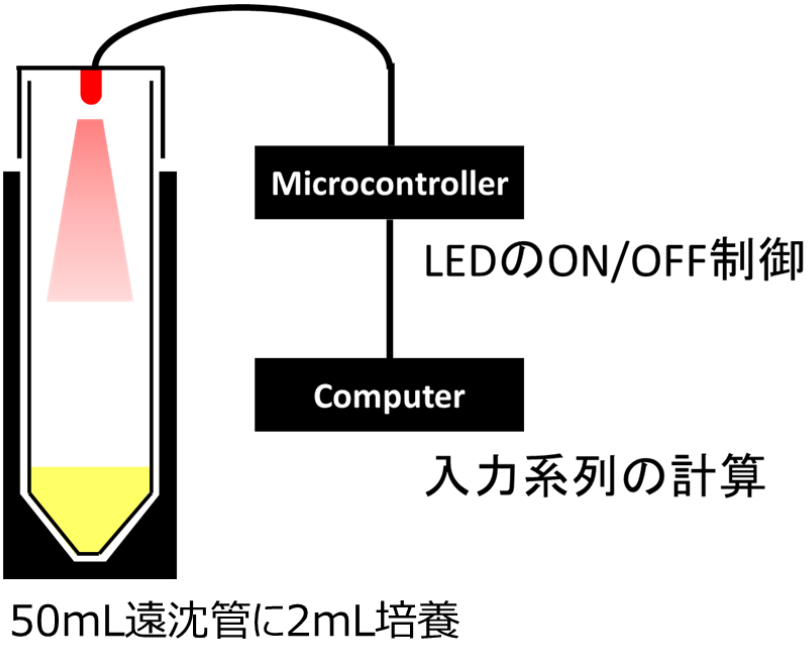


Figure 2-3　光照射装置

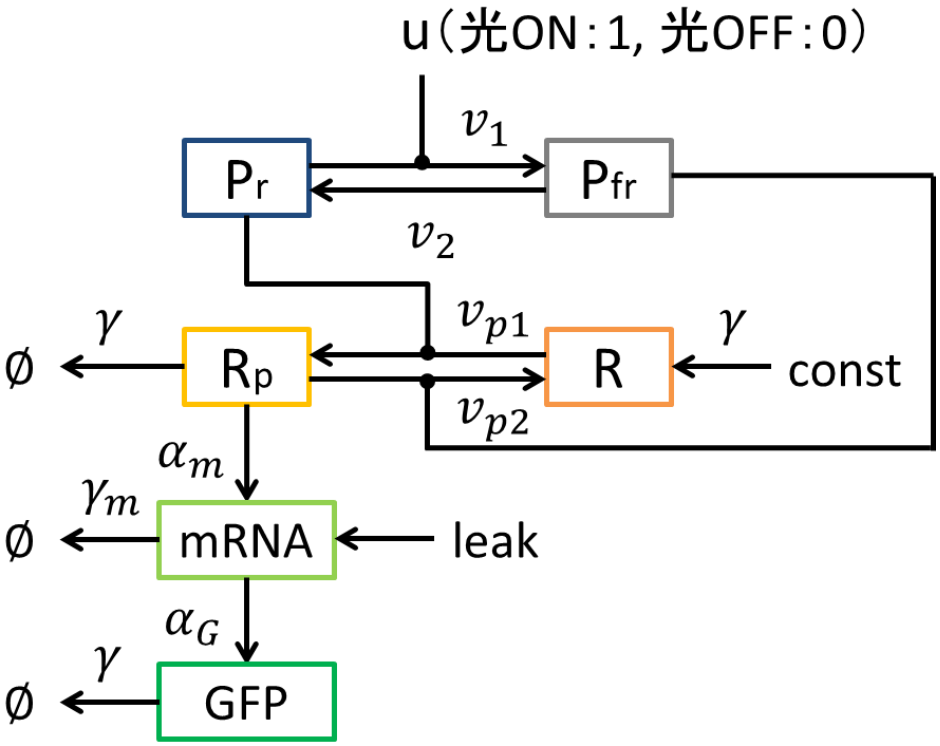


Figure 2-4　**Cph8-OmpR** システムのネットワーク図

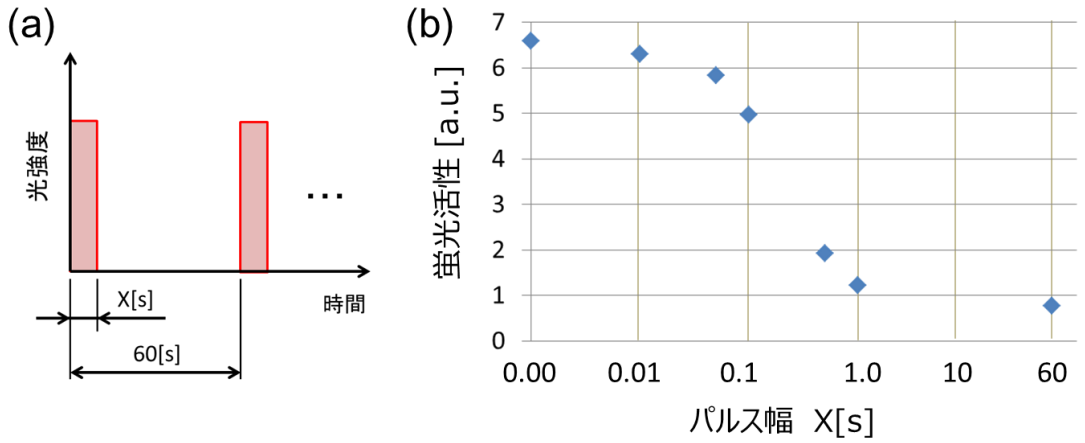


Figure 2-5　光パルス幅変更による Cph8-OmpR システムの応答

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）。

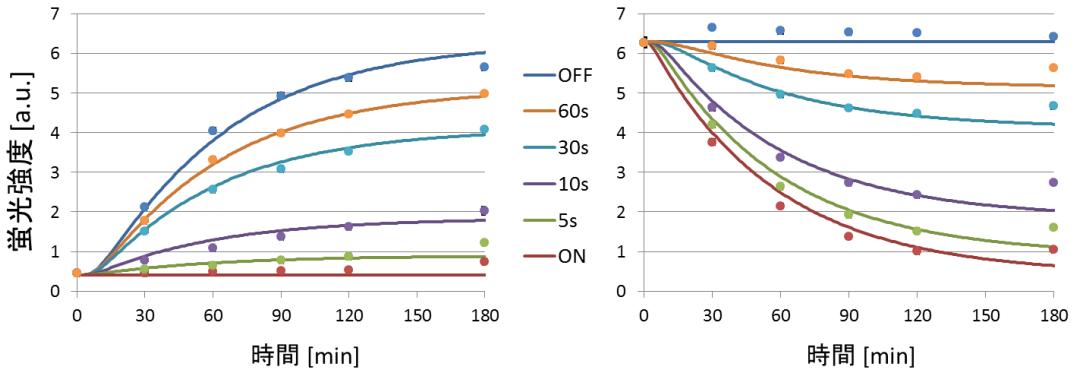


Figure 2-6　光パルス周期変更による Cph8-OmpR システムの応答

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。

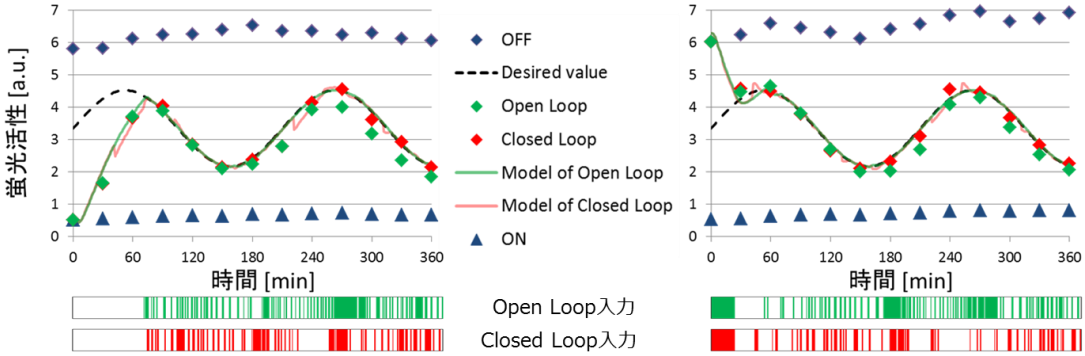


Figure 2-7　オープンループ制御とクローズドループ制御による Cph8-OmpR システム出力値の目標値追従制御

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。

Table 2-1　使用した株とプラスミド

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 2-2　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}
v_2	0.00001	0.1	s^{-1}	Transition rate from P_{fr} to P_r
P_{tot}	0.005	1	μM	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	μM	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
γ_m	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

Table 2-3　パラメータ同定結果

Parameter	Value
v_1	$0.499883[\mathrm{s}^{-1}]$
v_2	$0.000905[\mathrm{s}^{-1}]$
P_{tot}	$0.125480[\mu\mathrm{M}]$
v_{p1}	$0.134366[\mathrm{s}^{-1}\mu\mathrm{M}^{-1}]$
v_{p2}	$0.036881[\mathrm{s}^{-1}\mu\mathrm{M}^{-1}]$
γ	$0.000305[\mathrm{s}^{-1}]$
R_{tot}	$0.082036[\mu\mathrm{M}]$
α_m	$0.015811[\mathrm{s}^{-1}]$
n	2.541060
K_d	$0.05827[\mu\mathrm{M}^{-1}]$
γ_m	$0.030053[\mathrm{s}^{-1}]$
α_G	$0.004921[\mathrm{s}^{-1}]$
$leak$	$0.000764[\mathrm{s}^{-1}]$

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°C 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 O_2 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 cm^3（10 × 4 × 1 cm^3）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 cm^3（2 × 1.6 × 0.5 cm^3）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 cm^3 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/m^2/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―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：$F_{\mathrm{i,j,k}} = R_{i,j,k}/R_{i,0,k}$

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、16S rRNA 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–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–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（*p*s >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(*p*s ~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（*p*s <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°C 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°C 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(*p*s >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(≥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±0.1% vs. 3.1±0.4%）。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 *Thermosynechococcus*、730 nm 波長光での *Chloroflexus*、890 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ュ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°C）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°C）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）と *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* と *Meiothermus* の相互作用は過去に報告されており、*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 *Thermosynechococcsus* 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°C 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°C（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°C、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 16S rRNA 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。

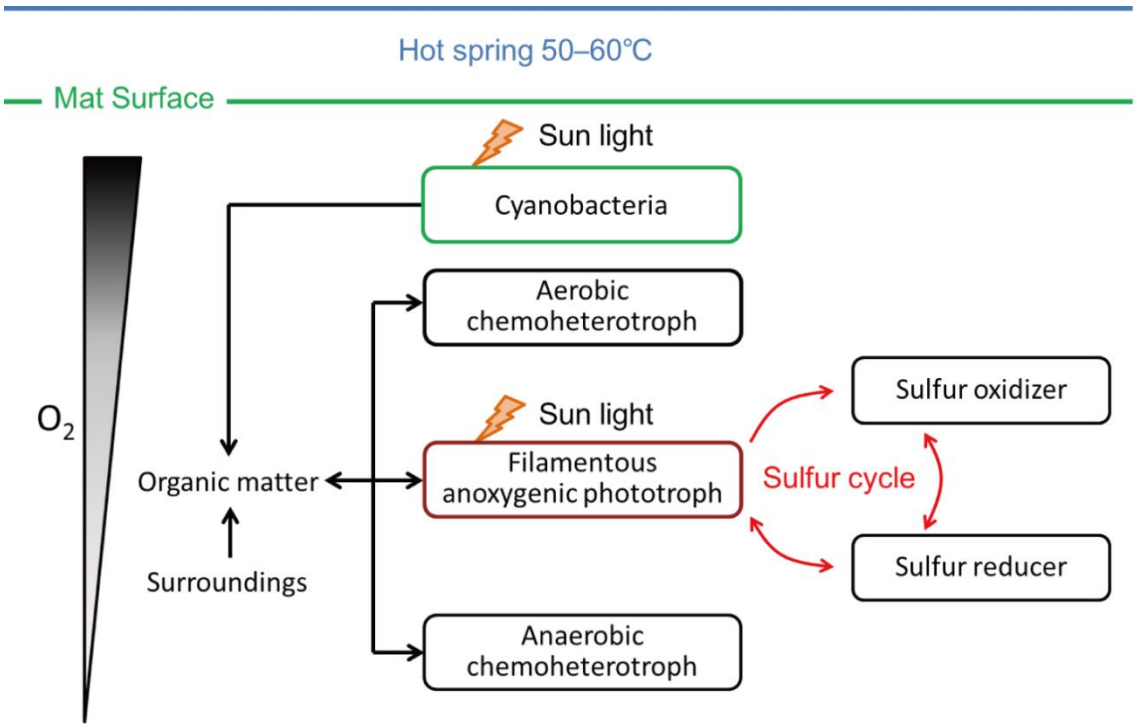


Figure 3-1　光合成微生物マットの概念図

光合成細菌であるシアノバクテリアは CO_2 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。

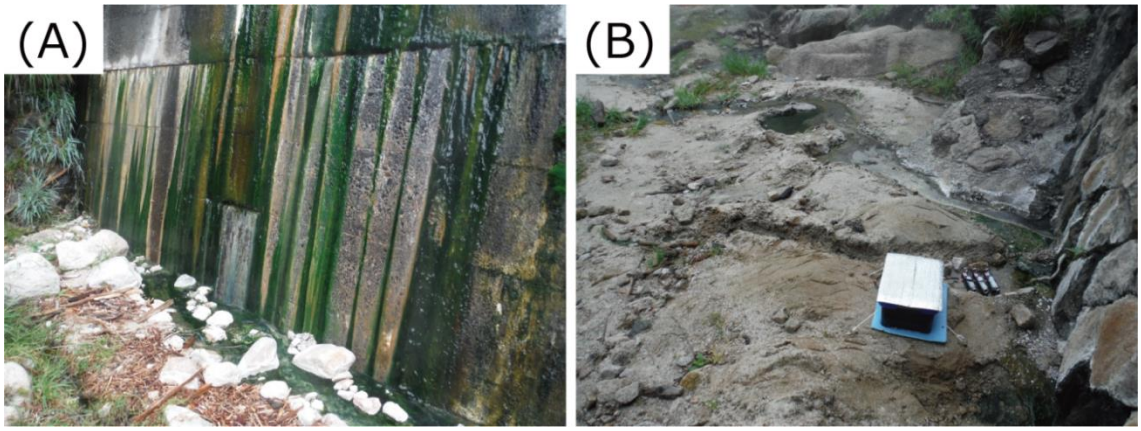


Figure 3-2　中房温泉の **Wall site** での壁面と **Site B** での水路

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。

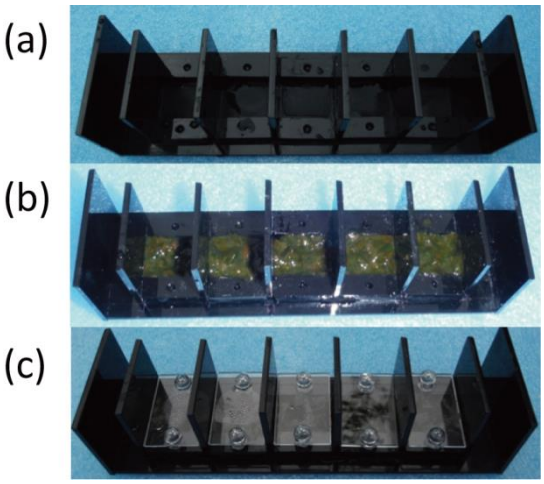
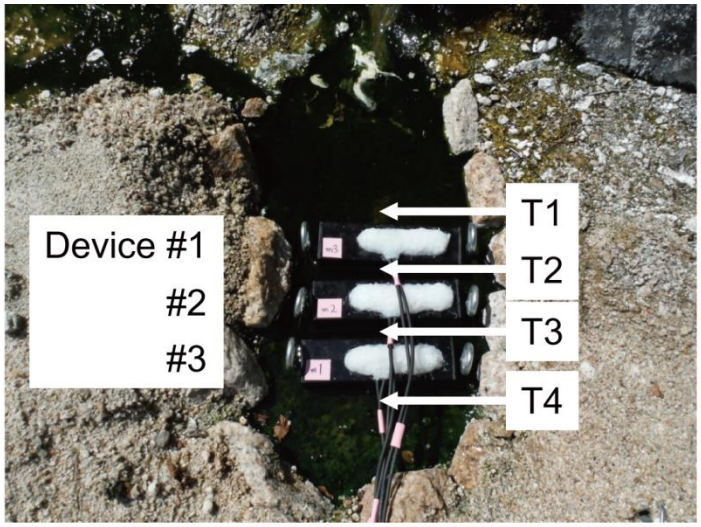


Figure 3-4　撹拌した微生物マットの光照射装置への設置

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



Temp. [°C]	T1	T2	T3	T4
0th day	58	56	55	53
7th day	57	54	53	50
14th day	53.5	52.5	50	46.5
20th day	57	54.5	52	49
Ave.	56.4	54.3	52.5	49.6

	pH
0th day	7.40
7st day	7.10
14th day	7.47
20th day	7.30
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）。

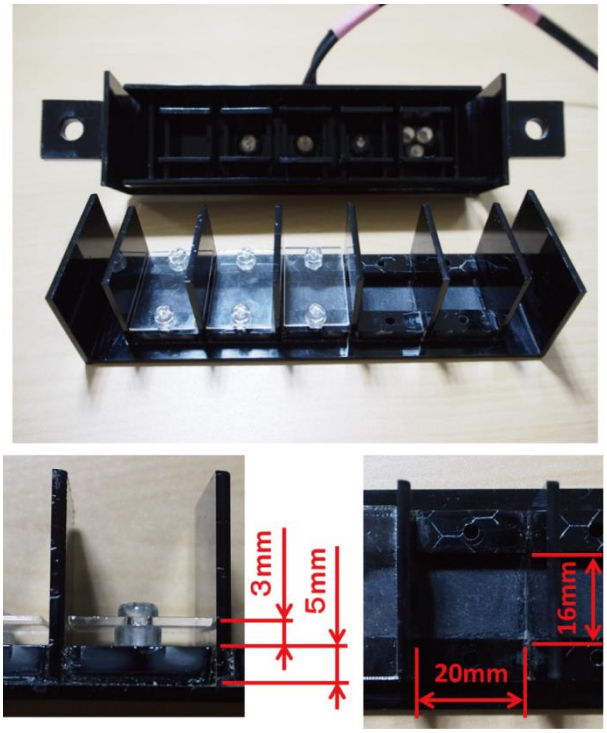


Figure 3-6　光照射装置

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。

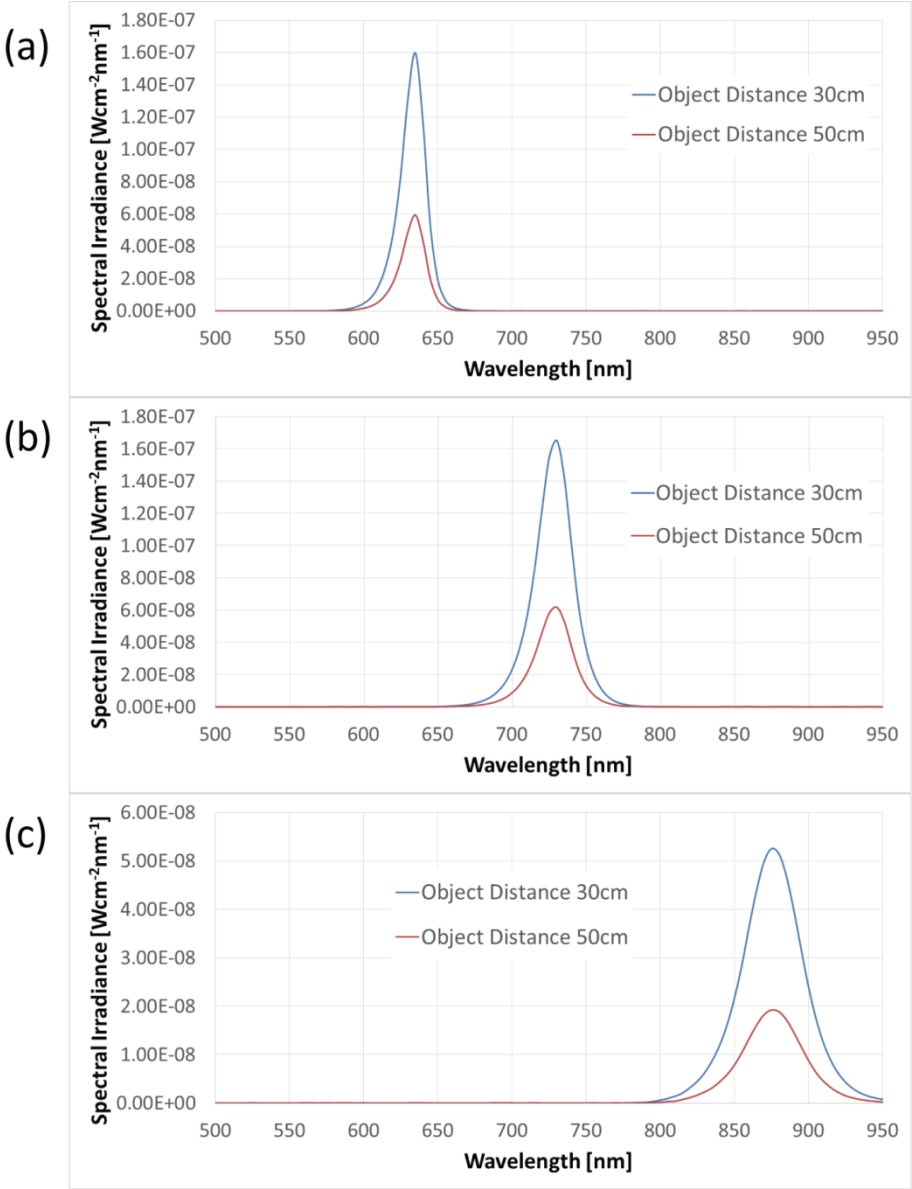


Figure 3-8　LED の光強度

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。

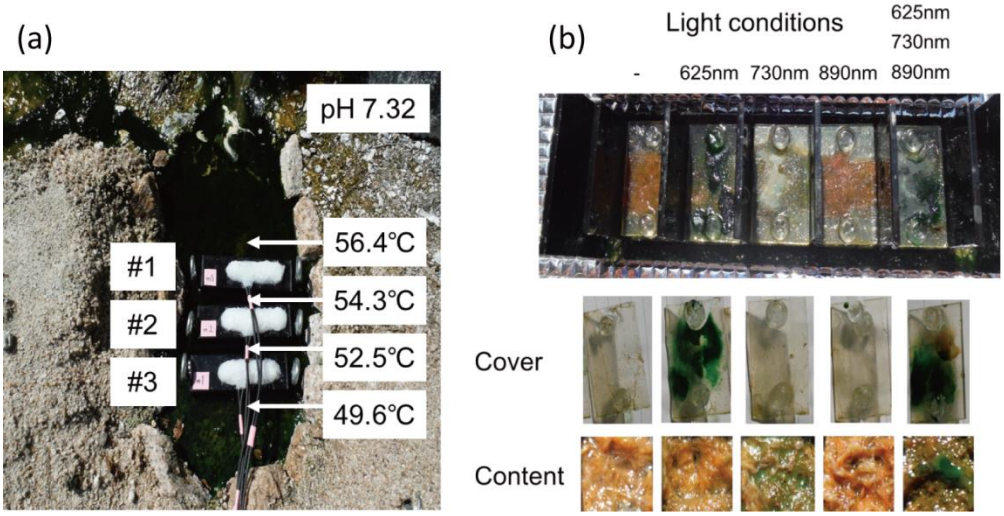


Figure 3-9　各波長での微生物マットの培養

（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。

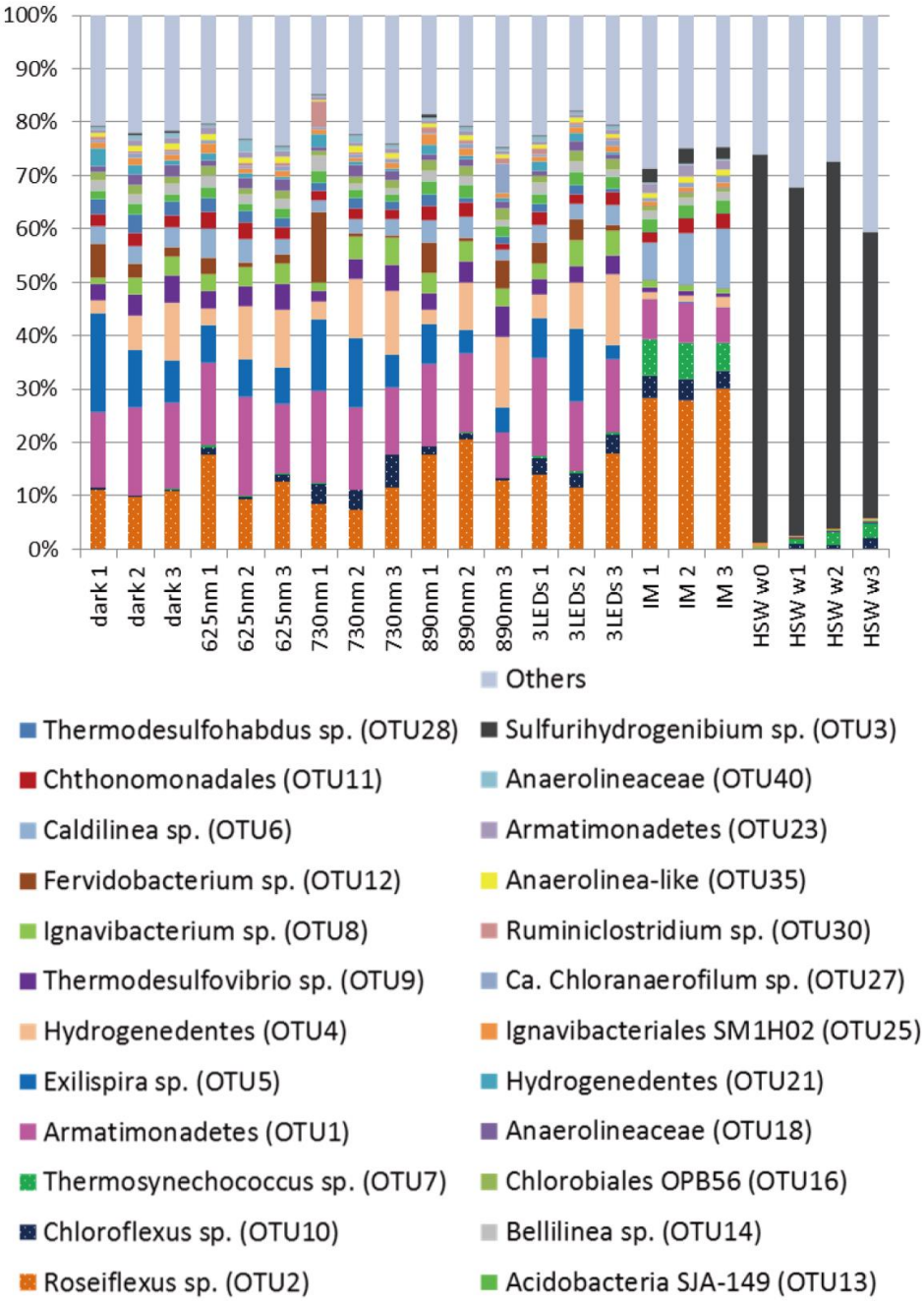
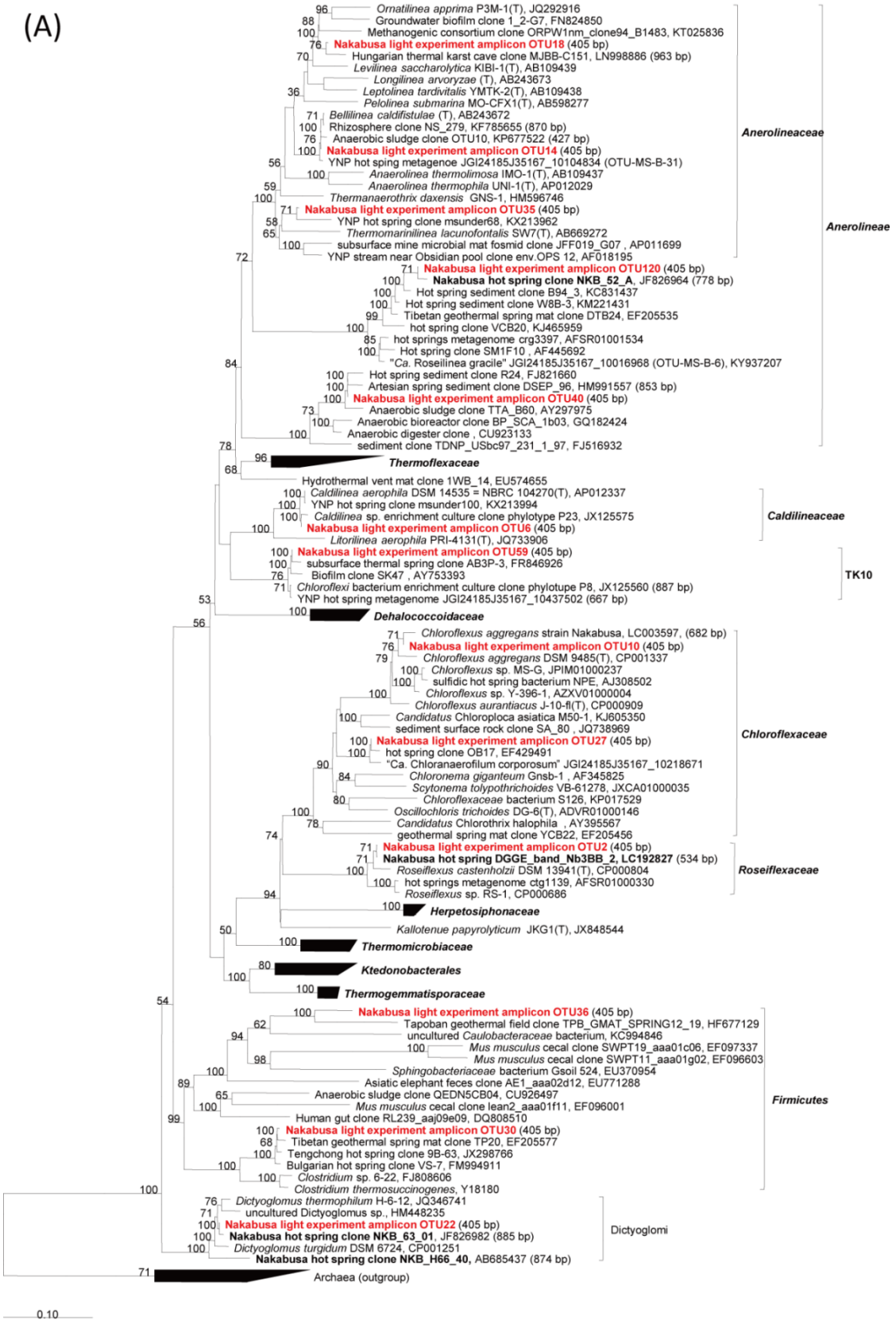


Figure 3-10　微生物マットと温泉水のコミュニティメンバーの相対量の違い
コミュニティメンバーの相対量は、培養前の微生物マット（IM）を 3 サンプル、625 nm 波長光、730 nm 波長光、890 nm 波長光で 20 日間培養された装置 3 台分の微生物マットを 16S rRNA 遺伝子解析した。暗闇と 3 波長混合条件はコントロールでもある。装置周辺の温泉水は 0、7、14、20 日目に継時的に採取した（それぞれ HSW w0、w1、w2、w3）。培養後の微生物マットで装置 3 台分の平均相対量がいずれかの光条件で 1%以上になった主要な微生物、3 種の光合成細菌、温泉水中で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

(A)


Ornatilinea apprima P3M-1(T), JQ292916
Groundwater biofilm clone 1_2-G7, FN824850
Methanogenic consortium clone ORPW1nm_clone94_B1483, KT025836
Nakabusa light experiment amplicon OTU18 (405 bp)
Hungarian thermal karst cave clone MJBB-C151, LN998886 (963 bp)
Levilinea saccharolytica KIBI-1(T), AB109439
Longilinea arvoryzae (T), AB243673
Leptolinea tardivitalis YMTK-2(T), AB109438
Pelolinea submarina MO-CFX1(T), AB598277
Bellilinea caldifistulae (T), AB243672
Rhizosphere clone NS_279, KF785655 (870 bp)
Anaerobic sludge clone OTU10, KP677522 (427 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU14 (405 bp)
YNP hot sping metagenoe JGI24185J35167_10104834 (OTU-MS-B-31)
Anaerolinea thermolimosa IMO-1(T), AB109437
Anaerolinea thermophila UNI-1(T), AP012029
Thermanaerothrix daxensis GNS-1, HM596746
Nakabusa light experiment amplicon OTU35 (405 bp)
YNP hot spring clone msunder68, KX213962
Thermomarinilinea lacunofontalis SW7(T), AB669272
subsurface mine microbial mat fosmid clone JFF019_G07 , AP011699
YNP stream near Obsidian pool clone env.OPS 12, AF018195
Nakabusa light experiment amplicon OTU120 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_52_A, JF826964 (778 bp)
Hot spring sediment clone B94_3, KC831437
Hot spring sediment clone W8B-3, KM221431
Tibetan geothermal spring mat clone DTB24, EF205535
hot spring clone VCB20, KJ465959
hot springs metagenome crg3397, AFSR01001534
Hot spring clone SM1F10 , AF445692
"Ca. Roseilinea gracile" JGI24185J35167_10016968 (OTU-MS-B-6), KY937207
Hot spring sediment clone R24, FJ821660
Artesian spring sediment clone DSEP_96, HM991557 (853 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU40 (405 bp)
Anaerobic sludge clone TTA_B60, AY297975
Anaerobic bioreactor clone BP_SCA_1b03, GQ182424
Anaerobic digester clone , CU923133
sediment clone TDNP_USbc97_231_1_97, FJ516932
Anerolineaceae
Anerolineae
Thermoflexaceae
Hydrothermal vent mat clone 1WB_14, EU574655
Caldilinea aerophila DSM 14535 = NBRC 104270(T), AP012337
YNP hot spring clone msunder100, KX213994
Caldilinea sp. enrichment culture clone phylotype P23, JX125575
Nakabusa light experiment amplicon OTU6 (405 bp)
Litorilinea aerophila PRI-4131(T), JQ733906
Caldilineaceae
Nakabusa light experiment amplicon OTU59 (405 bp)
subsurface thermal spring clone AB3P-3, FR846926
Biofilm clone SK47 , AY753393
Chloroflexi bacterium enrichment culture clone phylotupe P8, JX125560 (887 bp)
YNP hot spring metagenome JGI24185J35167_10437502 (667 bp)
TK10
Dehalococcoidaceae
Chloroflexus aggregans strain Nakabusa, LC003597, (682 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU10 (405 bp)
Chloroflexus aggregans DSM 9485(T), CP001337
Chloroflexus sp. MS-G, JPIM01000237
sulfidic hot spring bacterium NPE, AJ308502
Chloroflexus sp. Y-396-1, AZXV01000004
Chloroflexus aurantiacus J-10-fl(T), CP000909
Candidatus Chloroploca asiatica M50-1, KJ605350
sediment surface rock clone SA_80 , JQ738969
Nakabusa light experiment amplicon OTU27 (405 bp)
hot spring clone OB17, EF429491
"Ca. Chloranaerofilum corporosum" JGI24185J35167_10218671
Chloronema giganteum Gnsb-1 , AF345825
Scytonema tolypothrichoides VB-61278, JXCA01000035
Chloroflexaceae bacterium S126, KP017529
Oscillochloris trichoides DG-6(T), ADVR01000146
Candidatus Chlorothrix halophila , AY395567
geothermal spring mat clone YCB22, EF205456
Chloroflexaceae
Nakabusa light experiment amplicon OTU2 (405 bp)
Nakabusa hot spring DGGE_band_Nb3BB_2, LC192827 (534 bp)
Roseiflexus castenholzii DSM 13941(T), CP000804
hot springs metagenome ctg1139, AFSR01000330
Roseiflexus sp. RS-1, CP000686
Roseiflexaceae
Herpetosiphonaceae
Kallotenue papyrolyticum JKG1(T), JX848544
Thermomicrobiaceae
Ktedonobacterales
Thermogemmatisporaceae
Nakabusa light experiment amplicon OTU36 (405 bp)
Tapoban geothermal field clone TPB_GMAT_SPRING12_19, HF677129
uncultured Caulobacteraceae bacterium, KC994846
Mus musculus cecal clone SWPT19_aaa01c06, EF097337
Mus musculus cecal clone SWPT11_aaa01g02, EF096603
Sphingobacteriaceae bacterium Gsoil 524, EU370954
Asiatic elephant feces clone AE1_aaa02d12, EU771288
Anaerobic sludge clone QEDN5CB04, CU926497
Mus musculus cecal clone lean2_aaa01f11, EF096001
Human gut clone RL239_aaj09e09, DQ808510
Nakabusa light experiment amplicon OTU30 (405 bp)
Tibetan geothermal spring mat clone TP20, EF205577
Tengchong hot spring clone 9B-63, JX298766
Bulgarian hot spring clone VS-7, FM994911
Clostridium sp. 6-22, FJ808606
Clostridium thermosuccinogenes, Y18180
Firmicutes
Dictyoglomus thermophilum H-6-12, JQ346741
uncultured Dictyoglomus sp., HM448235
Nakabusa light experiment amplicon OTU22 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_63_01, JF826982 (885 bp)
Dictyoglomus turgidum DSM 6724, CP001251
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_40, AB685437 (874 bp)
Dictyoglomi
Archaea (outgroup)
0.10

(B)

Chlorobi bacterium enrichment culture clone phylotype P1, JX125553
YNP hot spring clone msunder94 (OTU-MS-B-45), KX213988
unidentified green sulfur bacterium OPS77, AF027011 (968 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU25 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_56_U2, JF826976 (839 bp)
Continental crust clone BE325FW032701CTS_hole1-17, DQ088767
Bor Khlung hot spring clone PK74, AY555793
SM1H02-group subsurface thermal spring clone OTU41/APA , AM902636
SM1H02-group clone DF5IPCant18h02, GQ921449
Chlorobi lineage 2 - SM1H02
Nakabusa light experiment amplicon OTU8 (405 bp)
Subsurface thermal spring clone 3D5, AM902626
Ignavibacterium album JCM 16511(T), CP003418
Sludge bioreactor clone SS-75 , AY945880
sediment clone 655939 , DQ404811
Sediment and soil clone LS4-176, AB234252
Melioribacter roseus P3M-2(T), CP003557
Dechlorinating microscosm clone TSAC14 , AB186805
vent snail foot clone SF_C4-C6 , AY327874
Brine-seawater interface clone ST-12K12, AJ347764
Chlorobi lineage 1 - Ignavibacteriales
Lava tube wall microbial mat clone GN40482f12, JN672544
Hilayan rhizophere clone S1P5011, KF145488 (690 bp)
Aerobic phosphorus-removal ecosystem clone PHOS-HC15 , AF314426
Nakabusa light experiment amplicon OTU41 (405 bp)
Benzene-degrading nitrate-reducing consortium clone Cart-N2 , AY118151
Trichlorobenzene-transforming microbial consortia clone SJA-28, AJ009458
Benzene-degrading nitrate-reducing consortium clone Cart-N3, AY118152
Sulfate-reducing reactor clone SR_FBR_L7, AY340835
Chlorobi lineage 4 - SJA-28
Chlorobiaceae
Chloroherpeton thalassium ATCC 35110(T), AF170103
"Ca. Thermochlorobacter aerophilum", AFSR01001300
YNP hot spring clone msunder26, KX213963
YNP hot spring metagenoe JGI24185J35167_10007615 (OTU-MS-B-38)
Geothermal spring mat clone YCB44, EF205451
Tibetan hot spring mat clone DTB25, EF205536
Tibetan hot spring clone RM64-B022, HQ287178 (765 bp)
YNP mesothermal mat clone F1BA05, FJ886696
Travertine depositional facies clone SM2A03, AF445706
Nakabusa light experiment amplicon OTU39 (405 bp)
High mountain lake epilithic biofilm clone Be_050, FR667432
Chlorobium sp. GBChIB, JPGV01000041
YNP Mammoth hot springs clone SM1B02, AF445652
Thermochlorobacteraceae
Chlorobi lineage 3 - BSV26
Nakabusa light experiement amplicon OTU16 (405 bp)
uncultured Chlorobi bacterium clone bacteriap24 , AF402977
Uzon caldera thermal pool clone ZB_P14_C06, GQ328682 (770 bp)
YNP hot spring metagenome JGI24185J35167_10066631 (OTU-Ms-B-29)
YNP hot spring clone msunder17, KX213911
unidentified bacterium clone OPB56 , AF027009
Biofilm clone ST19, JQ723643
Sludge clone A12b, AF234699
OPB56 group clone MFC-EB28, AJ630296
Freshwater clone 265ds10, AY212715
Paralvinella palmiformis mucus clone P. palm A 12, AJ441242
Nakabus light experiment amplicon OTU37 (405 bp)
Anaerobic bioreactor clone BUT1_OTUB73, JN995376
YNP hot spring metagenome rRNA gene contig_438 (OTU-MS-B-27)
Aerobic activated sludge clone HB70, EF648071
Aerobic activated sludge clone HB107, EF648096
Biofilm clone BIfdi48, AJ318130
Chlorobi lineage 5 - OPB56
Nakabusa light experiment amplicon OTU21 (405 bp)
Tibetan hot spring mat clone TP149, EF205586
Nakabusa light experiment amplicon OTU4 (405 bp)
YNP Hillside Springs microbial mat clone H4-B73, FJ207011 (817 bp)
Anoxic marine sediment clone LD1-PB16 (BRC1), AY114331
El Zacaton biomat clone S195MB92 (BRC1), FJ484805
Gasoline polluted soil clone GC0AA4ZA02PP1 (Candidate division BRC1), JQ919770
Hydrogenedentes (BRC1)
Sediment clone B40_4, KC831428
Industrial cooling water system clone C15, JQ323127
Nakabusa light experiment amplicon OTU62 (405 bp)
Subsurface thermal spring clone OTU24/APA UncPl296, AM902607
Hanford Site 300 subsurface clone HDB_SIOO1102, HM186253
Mixed grass prairie preserve clone FFCH17659, EU135263
Saline-alkaline soil clone TX2_6K10, JN178523
Coral associated bacterium clone Dstr_C19, GU118256
Gemmata obscuriglobus UQM 2246(T), ABGO01000527
Singulisphaera acidiphila DSM 18658, CP003364
Singulisphaera rosea, FN391026
Aquisphaera giovannonii OJF2(T), DQ986200
Isosphaera pallida ATCC 43644(T), CP002353
Planctomycetes
Archaea (outgroup)
0.10

(C)

Nakabusa light experiment amplicon OTU32 (405 bp)
hot spring sediment clone K19, FJ821628
Aerobic water treatment plant clone AB49, KF548238
South Canyon Hot Springs clone LKC09_005_33, JX521540
beta proteobacterium Rufe9b, AY235688
Biofiltration effluent biofilm clone BF117, DQ327692
Denitratisoma oestradiolicum, AY879297
Methyloversatilis thermotolerans, KC782839
Methyloversatilis universalis, DQ442273
Thiobacter subterraneus, AB180657
Hot spring clone W2B-24, KM221460
Nakabusa light experiment amplicon OTU46 (405 bp)
Thiobacter sp. SL-1, HM145961
Nakabusa light experiment amplicon OTU44 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NHS-06, AB199567
hot spring sediment clone A4, FJ821648
YNP hot spring clone OS-R, U46750
Thiobacillus aquaesulis, U58019
Hydrogenophilus islandicus, EU625664
Hydrogenophilus thermoluteolus, AB680730
Tepidiphilus margaritifer N2-214(T), AJ504663
Tepidiphilus succinatimandens BON4(T), AY219713
Betaproteobacteria
Dokdonella immobilis, FJ455531
Tahibacter aquaticus, AM981201
Dokdonella sp. CC-YHH031, GQ281768
Aquimonas voraii, AY544768
Silanimonas lenta DSM 16282, AUBD01000011
Vulcaniibacterium thermophilum, JQ746036
Dyella japonica, AB681770
Dyella marensis, AM939778
Luteibacter anthropi, FM212561
Luteibacter yeojuensis, DQ181549
Metallibacterium scheffleri, HQ909259
Mizugakiibacter sediminis, AB917594
Alla hot spring (Russia) clone Alla11otu10-1, KP676764
Great Artesian Basin clone G73, AF407710
Nakabusa light experiment amplicon OTU15 (405 bp)
Gammaproteobacteria
Nakabusa light experiment amplicon OTU28 (405 bp)
Oil well clone B8-67, KF448110 (772 bp)
hot spring sediment clone K10, FJ821627
Coffee Pots hot spring clone pCOF_65.7_D12, EU156147
Thermodesulforhabdus norvegica A8444(T), U25627
Thermodesulforhabdus sp. nov. M40/2 CIV-3.2, AF170420
Syntrophobacter sulfatireducens TB8106(T), AY651787
Syntrophobacter wolinii DSM 2805(T), X70905
Desulfomonile limimaris, AF230531
Desulfomonile tiedjei DSM 6799, CP003360
Smithella propionica, AF126282
Cockroach gut clone SL4, JN680673
Nakabusa light experiment amplicon OTU47 (405 bp)
Anaerobic digester clone CMW-172, FR775419
PAH-contaminated soil clone I1BF031, FQ659514
Anaerobic sludge clone B3, GU322885
Guerrero Negro hypersaline mat clone SBYH_3321, JN456302
Deltaproteobacteria
Roseomonas lacus, AJ786000
Roseomonas alkaliterrae strain YIM 78007(T), KF771274
Roseomonas sp. L1B40, LN614699
Rhodovarius lipocyclicus CCUG 44693(T), AJ633644
"Candidatus Roseovibrio tepidum" MT-C_18
Alla hot spring (Russia) clone Alla11otu18-1, KP676772
Nakabusa light experiment amplicon OTU29 (405 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU34 (405 bp)
Geothermal spring mat clone YCB86, EF205457
Elioraea tepidiphila DSM 17972(T), ARKI01000023
"Ca. Elioraea thermophila" JGI24185J35167_10309321 (OTU-MS-B-46)
Nakabusa light experiment amplicon OTU66 (405 bp)
YNP hot spring "MS-B_2012 SeqMan 97 Contig_61" (OTU-MS-B-96)
Bor Khlung hot spring clone PK324, AY555804
El Tatio geyser field clone Tat-08-009_38_69, GU437420
Candidatus Alysiosphaera europeae, AY428766
Alphaproteobacteria
YNP hot spring "MS-B_2012 SeqMan 97 Contig_19" (OTU-MS-B-10)
YNP Obsidian Pool clone env.OPS 2, AF018187
hot spring sediment clone GSB_L4LE11, DQ490013
YNP geothermal system clone GAL54, DQ324904
YNP Flat Cone clone YNP_SBC_FC_B31, HM448393
Nakabusa hot spring clone NKB_56_T2, JF826975 (858 bp)
Great Artesian Basin clone Y63, AF407680
Nakabusa light experiment amplicon OTU71 (405 bp)
EM3
Fervidobacterium islandicum, M59176
Fervidobacterium sp. YNP (OTU-107), AY151268
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_39, AB685436 (843 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_69_I, JF827015 (798 bp)
Fervidobacterium pennivorans DSM 9078, CP003260
Nakabusa light experiment amplicon OTU12 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_43, AB685429 (842 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_63_03, JF827017 (847 bp)
Thermotoga caldifontis AZM44c09(T), AP014509
Pseudothermotoga hypogea SEBR 7054(T), U89768
Pseudothermotoga thermarum DSM 5069(T), AB039769
Thermotogae
Archaea (outgroup)
0.10

(D)

Leptospira idonii (T), AB721966
Leptospira meyeri serovar Semaranga, FJ154599
Leptospira inadai LYME(T), Z21634
Leptospira licerasiae serovar Varillal VAR010(T), EF612284
Leptonema illini NCTC 11301(T), AY714984
Nakabusa light experiment amplicon OTU54 (405 bp)
YNP hot spring undermat clone msunder27, KX213921
Anaerobic bioreactor clone BUT1_OTUB69, JN995374
Anaerobic digestor clone vadinBA43, U81652
Guerrero Negro hypersaline mat clone SBYC_1695, JN446715
Methanogenic bioreactor clone HMTAb111, KM373086
anaerobic bioreactor sludge clone 29d08, EF515509
Sulfidic cave stream biofilm clone AS077_B37, GU390732
Nakabusa light experiment amplicon OTU5 (405 bp)
Exilispira thermophila RASEN(T), AB364473
Guaymas Basin hydrothermal sediment clone BAC1_39, KJ569656
Brachyspira aalborgi NCTC 11492(T), Z22781
Brachyspira alvinipulli C1(T), U23030
Spirochaeta
Alla hot spring clone Alla11otu15-1, KP676769
Nakabusa hot spring clone NKB_58_048, JF827014 (841 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU13 (405 bp)
Paludibaculum fermentans P105(T), KJ461654
YNP mesothermic microbial mats clone F2BB03, FJ885827
Nakabusa light experiment amplicon OTU38 (405 bp)
Acidobacteria bacterium KBS 96, FJ870384
Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076, CP000473
Nakabusa light experiment amplicon OTU26 (405 bp)
Geothermal spring mat clone TP32, EF205575
Chloracidobacterium thermophilum strain S, KP300946
Chloracidobacterium thermophilum B [T], CP002514
Candidatus Chloracidobacterium thermophilum BAC M60-018 J19, EF531339
Acidobacteria
Thermosynechococcus sp. NK55, NC_023033
Thermosynechococcus elongatus BP-1, BA000039
Nakabusa light experiment amplicon OTU7 (405 bp)
Thermosynechococcus lividus C1, AF132772
Cyanobacteria
Nakabusa light experiment amplicon OTU11 (405 bp)
Obsidian Pool clone OPB80, AF027089
YNP hot spring mat clone msunder54, KX213948
Tibetan hot spring mat clone TP125, EF205572
fumarolic soil clone ERBTW20082009OTU075, KF923317
Nakabusa light experiment amplicon OTU31 (405 bp)
Thermophilic microbial electrolysis cell biocathode clone H2TBiocatB_18, KC594814
Dam reservoir water clone Fei_13Dec90_28, AB930808
Fimbriimonas ginsengisoli Gsoil 348(T), GQ339893
Armatimonas rosea YO-36(T), AB529679
thermophilic anaerobic sludge cloen BS87, KF990110
Tibetan hot spring mat clone TP64, EF205567
Nakabusa light experiment amplicon OTU1 (405 bp)
YNP hot spring metagenome JGI24185J35167_10005843 (OTU-MS-B-18)
Anaerobic sludge clone, CU921202
Nakabusa light experiment amplicon OTU63 (405 bp)
Thermal pool clone ZB_P14_E11, GQ328697 (797 bp)
Armatimonadetes bacterium JGI 0000077-K19, KJ535399
Chthonomonas calidirosea T49(T), AM749780
candidate division OP10 clone OPB50, AF027092
YNP Mammoth Hot Springs clone SM2G08, AF445740
clone SM2H09, AF445745
YNP Mushroom and Octopus Spring hot springs metagenome ctg1496, AFSR01002962
YNP hot spring enrichment metagenome OTU-3
Nakabusa light experiment amplicon OTU23 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_56_N2, JF826973 (813 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_66_H, JF826989 (778 bp)
Armatimonadetes (OP10)
Nakabusa hot spring clone NKB_63_50, JF826987 (863 bp)
uncultures Thermodesulfovibrio sp. clone 0307_BDM1_32, JQ515456
Nakabusa light experiment amplicon OTU9 (405 bp)
Tengchong hot spring clone 15-B-13, KM221372
Tibetan hot spring mat clone DTM60, EF205519
Thermodesulfovibrio aggregans TGE-P1(T), AB021302
Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347(T), CP001147
Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus Hbr5(T), EF081294
Nitrospirae
Caldimicrobium thiodismutans, LC055107
Nakabusa hot spring clone NKB_63_56, JF826988 (893 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU45 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_Tdeso_05, AB685444 (684 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_Tdeso_04, AB685443 (683 bp)
Caldimicrobium rimae DS(T), EF554596
Nakabusa hot spring clone NKB_H66_Tdeso_01, AB685440 (683 bp)
US Great Basin hot spring sediment clone SSE_L2_A02, EU635933
Thermodesulfobacterium commune DSM 2178(T), AF418169
Thermodesulfobacterium thermophilum DSM 1276(T), ATXI01000006
Thermodesulfobacteria
Nakabusa light experiment amplicon OTU33 (405 bp)
Meiothermus hypogaeus, AB586707
sediment clone B76_2, KC831433
Alla hot spring clone Alla11otu22-1, KP676810
Tengchong hot spring clone W2B-3, KM221426
Meiothermus cerbereus, Y13594
Meiothermus ruber DSM 1279(T), CP005385
Meiothermus rufus DSM 22234, FN178496
Thermus arciformis, EU247889
Nakabusa hot spring clone NKB_58_047, JF826980 (860 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU67 (405 bp)
Thermus islandicus PRI-3838(T), EU753247
Thermus aquaticus YT-1(T), L09663
Deinococcus-Thermus
Nakabusa hot spring clone NKB_58_202, JF826997 (853 bp)
Nakabusa hot spring, white mats clone ST-B02_2, AB735170 (628 bp)
Nakabusa light experiment amplicon OTU3 (405 bp)
Nakabusa hot spring clone NKB_56_E2, JF826996 (784 bp)
Sulfurihydrogenibium subterraneum, AB071324
Sulfurihydrogenibium azorense Az-Fu1, AF528192
Sulfurihydrogenibium kristjanssonii, AM778960
Sulfurihydrogenibium rodmanii, AM259502
Hydrogenobacter subterraneus HGP1 [T], AB026268
Nakabusa hot spring clone NKB_69_H2, JF826993 (807 bp)
Hydrogenobacter hydrogenophilus Z-829 (DSM-2913)[T], Z30242
Thermocrinis minervae, AM260555
Thermocrinis ruber DSM 23557(T), CP007028
Nakabusa hot spring clone NKB_66_U, JF826991 (850 bp)
Aquificae
Archaea (outgroup)
0.10

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。

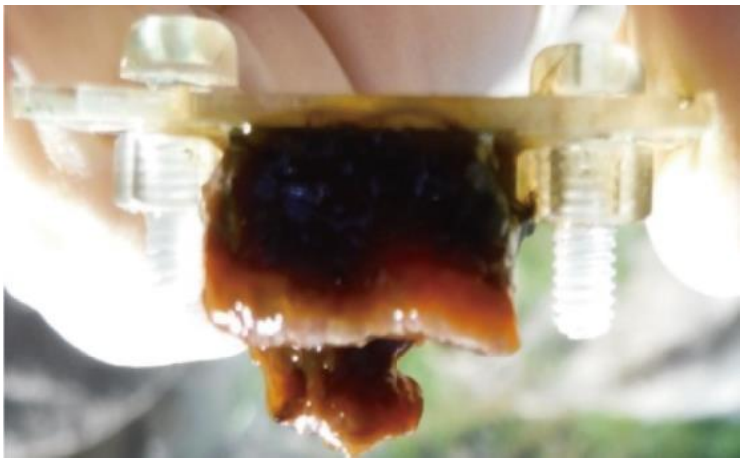


Figure 3-12　装置 1 の 730 nm 波長光培養後の微生物マットの層構造形成

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。

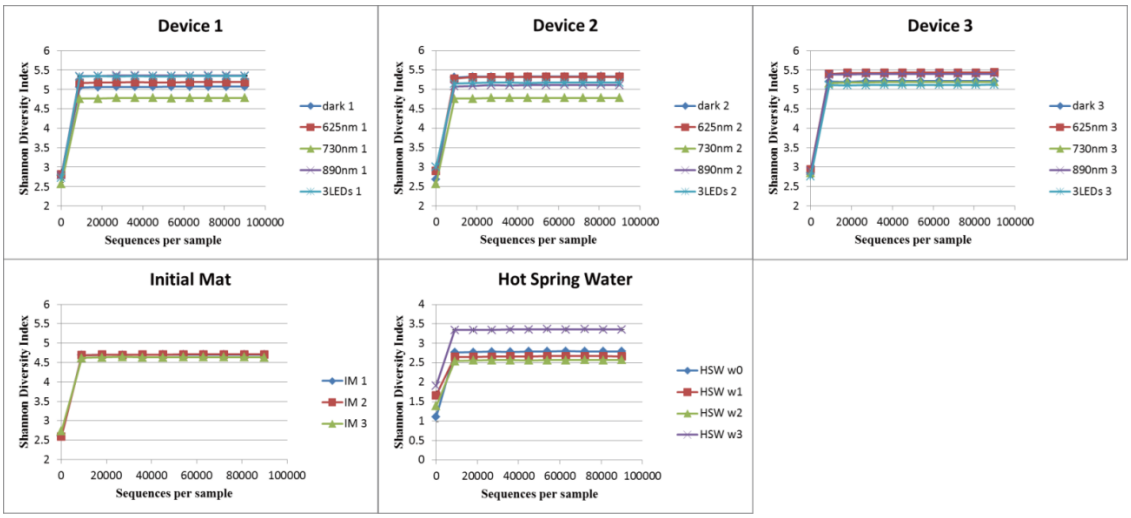


Figure 3-13　Shannon Diversity Index の Rarefaction curves（n=10、平均±1SE）

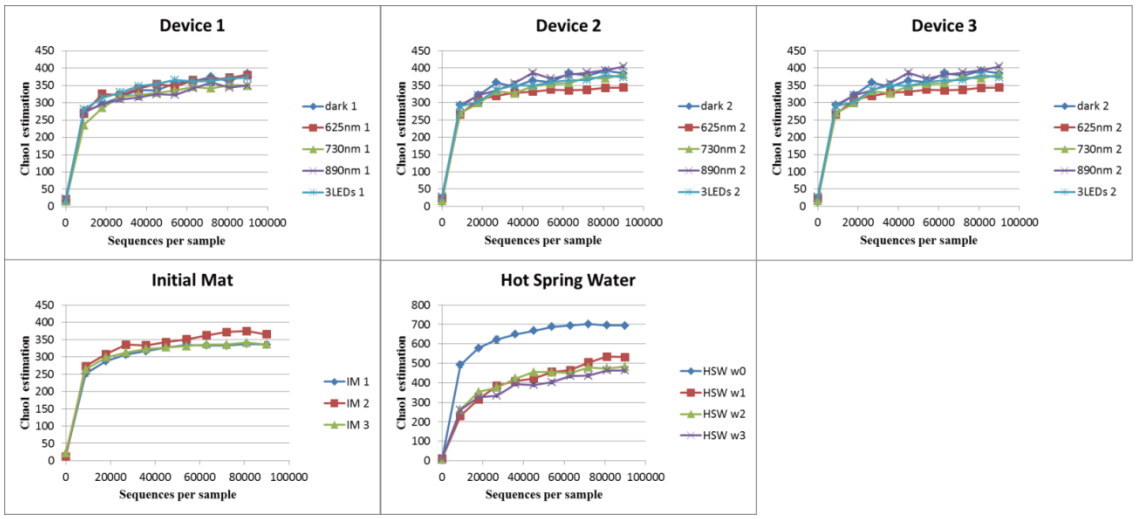


Figure 3-14　Chao1 の Rarefaction curves（n=10、平均±1SE）

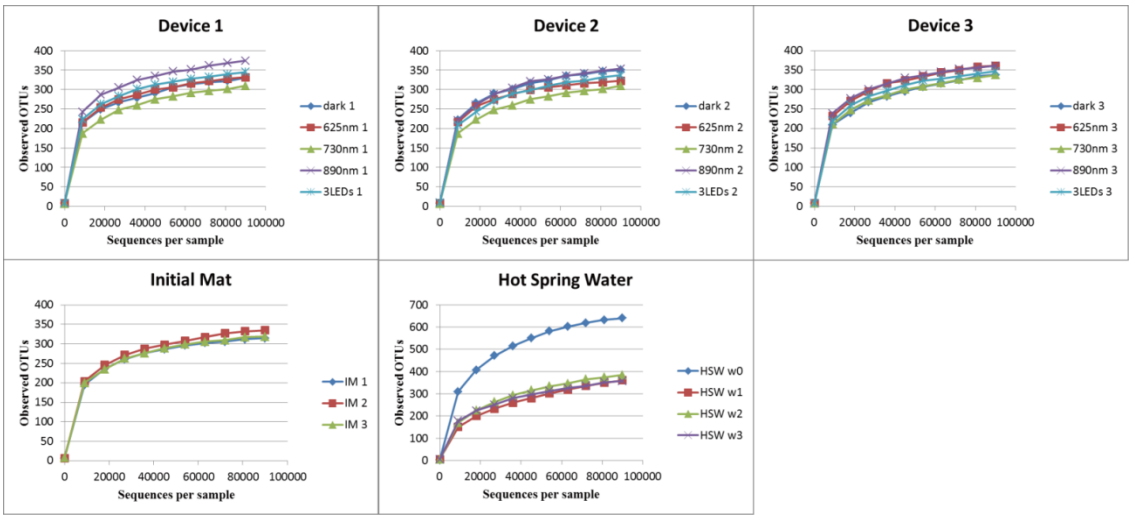


Figure 3-15　observed OTUs の Rarefaction curves（n=10、平均±1SE）

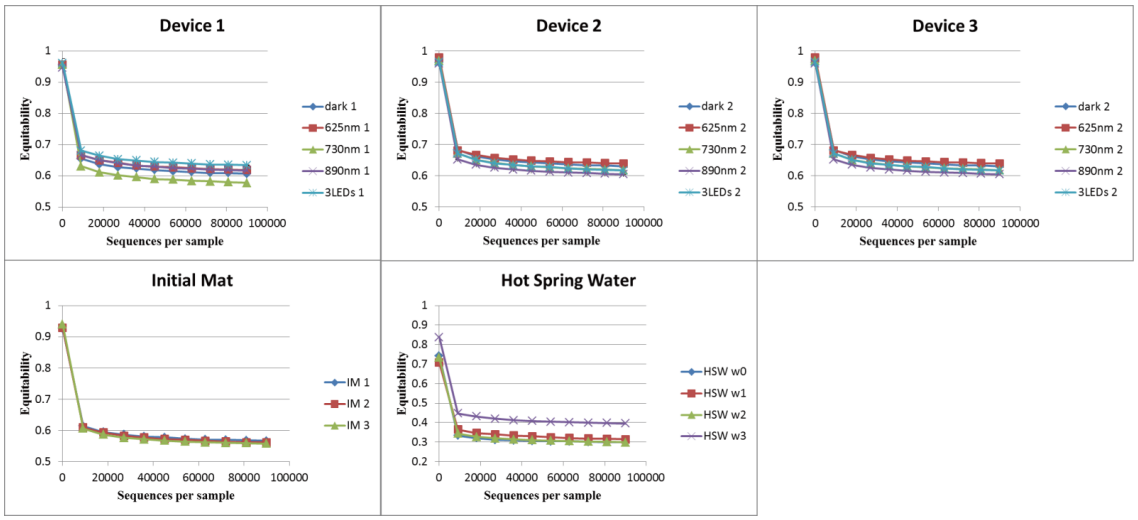


Figure 3-16　Equitability の Rarefaction curves（n=10、平均±1SE）

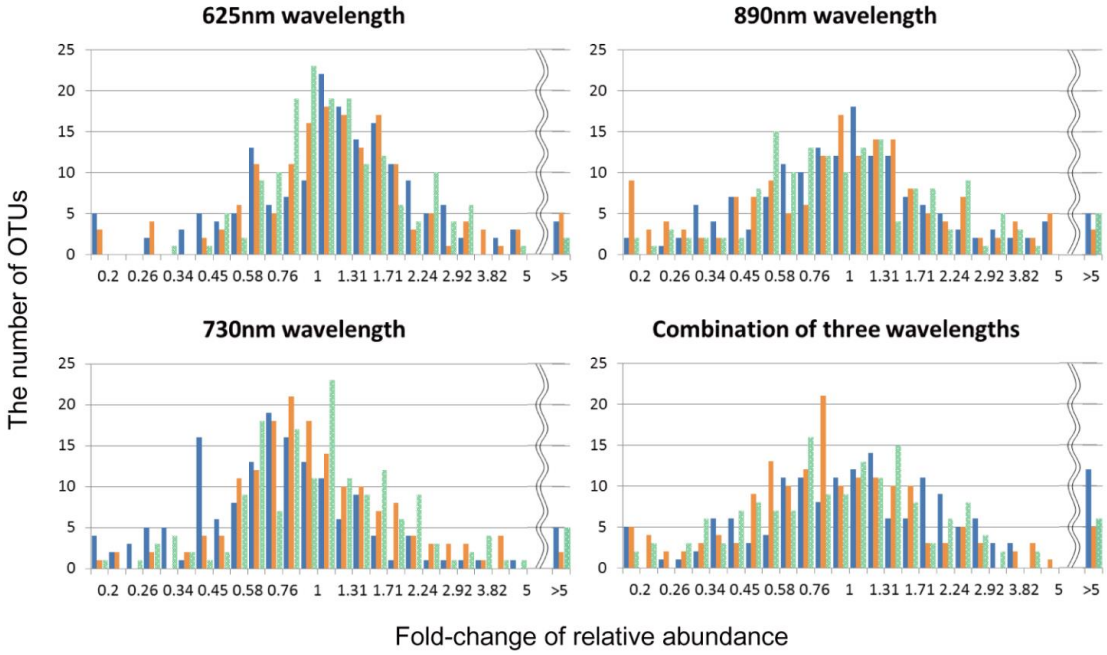


Figure 3-17　それぞれの光条件での相対量 Fold change の片対数ヒストグラム
暗闇条件をコントロールとした、それぞれの OTU の相対量の Fold change をヒストグラムとして、装置 1、2、3 を青、オレンジ、緑で表すことによって表示する。対数の底は 51/12 としている。

Table 3-1 16S rRNA 遺伝子配列に使ったプライマー

sample	primer name	sequence
forward primer		
all samples	ORI342F1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTACGGGGGGCAGCAG
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	362422	394428	366616	335344	357374	359330	359330	389863	278605	252583
Phix genome removed sequences	323651	326327	303768	294210	300785	259186	308625	309469	234430	214491
Trimmed/processed sequences	119654	128079	130467	115579	121624	100773	163389	176818	135270	119840
OTUs	358	357	369	326	352	324	685	447	429	385

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 ID	Taxa	Relative abundance (average)						BLAST (all)	acc. No.	Identity	e-value
		Dark	625nm	730nm	890nm	3LEDs	IM†	BLAST (typestrain)			
OTU2	Chloroflexi, Roseiflexus	10.8%	13.4%	9.3%	17.3%	14.7%	28.9%	Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%	0
								Roseiflexus castenholzii strain DSM 13941	CP000804.1	100%	0
OTU10	Chloroflexi, Chloroflexus	0.3%	1.1%	4.6%	1.0%	3.1%	3.8%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01	AB685439.1	100%	0
								Chloroflexus aggregans DSM 9485	CP001337.1	99%	0
OTU7	Cyanobacteria, Thermosynechococcus	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%	6.3%	Thermosynechococcus sp. NK55	CP006735.1	100%	0
								Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%	2E-150
OTU1	Armatimonadetes, unc.	15.6%	15.7%	15.0%	12.9%	15.0%	7.2%	hot spring uncultured bacterium clone TP54	EF205567.2	100%	0
								Pelotomaculum thermopropionicum SI	AP009389.1	85%	4E-113
OTU5	Spirochaetae, Exilispira	12.5%	7.1%	10.9%	5.5%	8.0%	0.0%	thermophilic uncultured bacterium clone HMTAb111	KM373086.1	99%	0
								Exilispira thermophila strain RASEN	NR_041644.1	85%	5E-112
OTU4	Hydrogenedentes, unc.	6.5%	7.9%	8.7%	8.2%	8.8%	1.5%	hot spring ucultured bacterium clone H4-B73	FJ207011.1	99%	0
								Aliifodinibius sediminis strain YIM J21	NR_118429.1	80%	3E-69
OTU9	Nitrospirae, Thermodesulfovibrio	4.0%	4.0%	3.6%	4.2%	3.1%	0.7%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_63_50	JF826987.1	100%	0
								Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347	CP001147.1	97%	0
OTU8	Chlorobi, Ignavibacterium	2.6%	3.4%	3.6%	3.6%	4.1%	1.2%	hot spring uncultured bacterium clone OTU42/APA	AM902626.1	98%	0
								Ignavibacterium album JCM 16511	CP003418.1	97%	0
OTU12	Thermotogae, Fervidobacterium	3.6%	1.9%	4.8%	3.9%	3.0%	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_43	AB685429.1	100%	0
								Fervidobacterium riparium strain 1445t	NR_108234.1	99%	0
OTU6	Chloroflexi, Caldilinea	3.4%	4.3%	2.7%	3.4%	3.4%	9.4%	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%	0
								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

	Chthonomonadales							Thermanaerovibrio acidaminovorans strain DSM 6589	NR_074520.1	85%	3E-109
OTU28	Deltaproteobacteria, Thermodesulforhabdus	3.0%	2.2%	1.7%	1.5%	1.4%	0.0%	thermophilic uncultured delta proteobacterium clone B8-67 Thermodesulforhabdus norvegica strain A8444	KF448110.1 NR_025970.1	100% 92%	0 5E-157
OTU13	Acidobacteria, SJA-149	1.7%	1.7%	1.6%	2.2%	2.1%	2.4%	hot spring uncultured bacterium clone Alla11otu15-1 Paludibaculum fermentans strain P105	KP676769.1 NR_134120.1	100% 95%	0 2E-180
OTU14	Chloroflexi, Bellilinea	1.8%	1.9%	1.7%	1.7%	1.9%	1.5%	thermophilic uncultured bacterium clone OTU10 Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1	KP677522.1 NR_041354.1	100% 100%	0 0
OTU16	Chlorobi, OPB56	1.6%	1.4%	1.3%	2.0%	1.7%	0.9%	hot spring uncultured bacterium clone ZB_P14_C06 Thermosulfidibacter takaii ABI70S6	GQ328682.1 AP013035.1	99% 82%	0 5E-87
OTU18	Chloroflexi, Anaerolineaceae	1.8%	1.8%	1.5%	1.2%	1.2%	0.0%	thermophilic uncultured bacterium clone MJBB-C151 Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1	LN998886.1 NR_041354.1	99% 94%	0 2E-170
OTU21	Hydrogenedentes	2.0%	1.0%	1.2%	1.2%	1.2%	0.0%	hot spring uncultured bacterium clone TP149 Paracoccus laeviglucosivorans strain 43P	EF205586.1 NR_145640.1	93% 83%	2E-167 3E-64
OTU25	Chlorobi, SM1H02	1.1%	1.2%	0.9%	1.3%	1.1%	0.9%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_56_U2 Ignavibacterium album strain JCM 16511	JF826976.1 NR_074698.1	100% 88%	0 3E-134
OTU27	Chloroflexi, Ca. Chloranaerofilum	0.6%	0.7%	0.6%	2.2%	0.7%	0.9%	hot spring uncultured Chloroflexi bacterium clone OB17 Oscillochloris trichoides strain DG-6	EF429491.2 NR_114470.1	100% 92%	0 2E-160
OTU30	Firmicutes, Ruminiclostridium	0.6%	0.4%	1.8%	0.9%	0.6%	0.1%	thermophilic uncultured bacterium clone 9B-63 Ruminiclostridium thermocellum strain ATCC 27405	JX298766.1 NR_074629.1	99% 93%	0 1E-168
OTU35	Chloroflexi, Anaerolinea-like	0.9%	1.0%	0.8%	0.8%	0.7%	1.1%	hot spring uncultured bacterium clone msunder68 Thermomarinilinea lacunifontana strain SW7	KX213962.1 NR_132293.1	99% 92%	0 5E-162
OTU23	Armatimonadetes, unc.	0.9%	1.1%	0.7%	0.7%	0.8%	1.8%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_56_N2 Thermosediminibacter oceani DSM 16646	JF826973.1 CP002131.1	100% 85%	0 5E-112
OTU40	Chloroflexi, Anaerolineaceae	0.8%	1.2%	0.8%	0.5%	0.6%	0.3%	thermophilic uncultured Chloroflexi bacterium clone 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	AB735170.1	100%	0
								Sulfurihydrogenibium azorense strain Az-Fu1	NR_102858.1	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）

OTU ID	Taxa	Standard deviation						Coefficient of variation					
		Dark	625nm	730nm	890nm	3LEDs	IM†	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

Table 3-5　光による影響を受けた微生物マットメンバー

OTU ID	Taxa	Relative abundance										BLAST (all) BLAST (typestrain)	acc. No.	Identity
		Dark		625 nm		730 nm		890 nm		3LEDs				
		Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD			
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	Chloroflexi, Chloroflexus	0.3%	0.1%	1.1%	0.5%	4.6%	1.3%	1.0%	0.6%	3.1%	0.4%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_H66_01	AB685439.1	100%
												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%
												Coleofasciculus chthonoplastes strain SAG 2209	NR_125521.1	91%
OTU34	Alphaproteobacteria, 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%
												Elioraea tepidiphila strain TU-7	NR_044259.1	96%
OTU27	Chloroflexi, Chloroflexaceae	0.6%	0.2%	0.7%	0.2%	0.6%	0.2%	2.2%	2.9%	0.7%	0.4%	hot spring uncultured Chloroflexi bacterium clone OB17	EF429491.2	100%
												Oscillochloris trichoides strain DG-6	NR_114470.1	92%
OTU120	Chloroflexi, 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%
												Thermomarinilinea lacunifontana strain SW7	NR_132293.1	88%
OTU26	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%
												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%
												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%
												Fervidobacterium riparium strain 1445t	NR_108234.1	99%
OTU28	Deltaproteobacteria, Thermodesulforhabdus	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%
												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	Deinococcus-Thermus, Thermus	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%
												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%
OTU30	Firmicutes, Ruminiclostridium 1	0.6%	0.1%	0.4%	0.3%	1.8%	2.6%	0.9%	0.3%	0.6%	0.3%	thermophilic uncultured bacterium clone 9B-63	JX298766.1	99%
												Ruminiclostridium thermocellum strain ATCC 27405	NR_074629.1	93%
OTU41	Chlorobi, SJA-28	0.1%	0.1%	0.4%	0.3%	0.7%	0.8%	0.5%	0.4%	0.4%	0.4%	uncultured soil bacterium clone S1P5011	KF145488.1	95%
												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 3-6　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

	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

† 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 ID	Taxa	Relative abundance										BLAST (all) BLAST (typestrain)	acc. No.	Identity
		Initial mat					Experimental mats (Ave.)							
		1	2	3	Ave.	SD	Dark	625 nm	730 nm	890 nm	3 LEDs			
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%
OTU6	Chloroflexi, Caldilinea	7.0%	9.8%	11.2%	9.4%	2.1%	3.4%	4.3%	2.7%	3.4%	3.4%	Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%
												Caldilinea tarbellica strain D1-25-10-4	NR_117797.1	100%
OTU1	Armatimonadetes, unc.	7.4%	7.5%	6.7%	7.2%	0.5%	15.6%	15.7%	15.0%	12.9%	15.0%	hot spring uncultured bacterium clone TP54	EF205567.2	100%
												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%
												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%
												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%
												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%
												Thermanaerovibrio acidaminovorans strain DSM 6589	NR_074520.1	85%
OTU3	Aquificae, Sulfurihydrogenibium	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%
												Sulfurihydrogenibium azorense strain Az-Fu1	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%
												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%
												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%
												Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1	NR_041354.1	100%
OTU4	Hydrogenedentes, unc.	1.4%	1.2%	1.8%	1.5%	0.3%	6.5%	7.9%	8.7%	8.2%	8.8%	hot spring ucultured bacterium clone H4-B73	FJ207011.1	99%
												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%
												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%
												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

OTU ID	Taxa	Relative abundance Hot spring water 0th	7th	14th	20th	Ave.	SD	BLAST (all) BLAST (no Env) BLAST (typestrain)	acc. No.	Identity
OTU3	Aquificae, Sulfurihydrogenibium	72.7%	65.1%	68.6%	53.5%	65.0%	8.2%	hot spring uncultured Aquificaceae bacterium clone ST-B02_2	AB735170.1	100%
								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%
OTU19	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%
								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	Bacteroidetes, env.OPS 17	0.2%	1.0%	1.3%	1.9%	1.1%	0.7%	hot spring unidentified Cytophagales OPB73	AF027008.1	100%
								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	1.9%	0.7%	0.8%	0.9%	1.1%	0.5%	hot spring uncultured bacterium clone NKB_58_047	JF826980.1	100%
								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	Aquificae, Thermocrinis	2.1%	0.3%	0.3%	0.2%	0.7%	0.9%	hot spring uncultured bacterium clone kua138	HM150304.1	97%
								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°C 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。

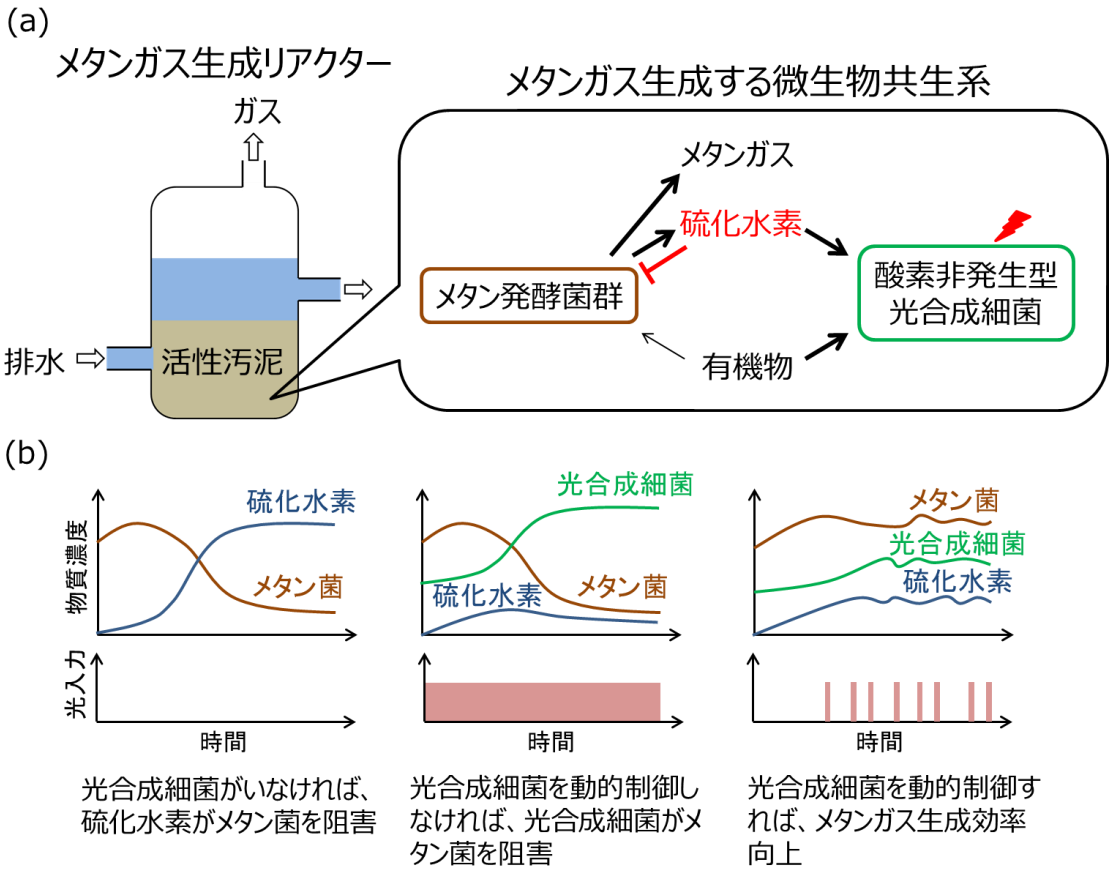


Figure 4-1　メタンガス生成する微生物共生系

（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 中央）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.
2. 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.
6. 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.
8. 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.
10. Chuang JS. Engineering multicellular traits in synthetic microbial populations. Curr Opin Chem Biol. 2012;16(3–4):370–8.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
15. 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.
17. 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.
21. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
30. 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.
32. Lim WA. Designing customized cell signalling circuits. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(6):393–403.
33. 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.
34. 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.
36. 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.
37. 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.
50. 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.
53. 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.

56. 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.
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.
62. 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.
69. 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).
70. Madigan MT, Brock TD. Photosynthetic Sulfide Oxidation by Chloroflexus aurantiacus, a Filamentous, PhotosyntheticGliding Bacterium. J Bacteriol. 1975;122(2):782–4.
71. 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.
77. 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.
80. 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.
82. 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.
89. 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.
96. 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.
102. 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.
106. 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.
108. 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.
117. 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.

130. 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.
139. 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.
144. 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.
147. McEwen JT, Atsumi S. Alternative biofuel production in non-natural hosts. Curr Opin Biotechnol. 2012;23(5):744–50.
148. 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。