

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14424

研究課題名（和文）自由生活性細菌ゲノムの縮小進化に迫る

研究課題名（英文）Exploring the rules of reductive genome evolution in free-living bacteria

研究代表者

中井 亮佑（Nakai, Ryosuke）

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：90637802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、国内河川水から分離した自由生活性（自立的な増殖が可能）の極微小細菌 *Aurantimicrobium minutum* のゲノム解析を行った。その結果、本細菌のゲノムサイズは約1.6 Mbpと極めて小さく、その代謝系は単純化ないし合理化されていた。他の細菌が作り出す代謝産物に依存してきた結果として、自身にとって負担の大きい代謝機能に関する遺伝子群を失うようにゲノム縮小が進んできたと考えられる。また、ロドプシン様の遺伝子を有することから、本細菌が光エネルギーをその増殖や生存に利用する可能性も明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This study determined the complete genome sequence of *Aurantimicrobium minutum*, a free-living planktonic ultramicrobacterium isolated from river water in western Japan. This strain has an extremely small, streamlined genome of approximately 1.6 Mb. Such a reduction in genome size may be associated with lowering resource costs. Additionally, genomic annotation of this strain suggests that it undergoes rhodopsin-based photometabolism.

研究分野：微生物生態学

キーワード：ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の関心は「生物サイズの極限」であり、極微小生物の探索研究として、濾過除菌に汎用される孔径 0.2 マイクロメートル (μm) のフィルターを用いて様々な環境試料を濾過し、その濾液 (以下、0.2 μm 濾液) からフィルターを通り抜ける程に小さな濾過性細菌を報告してきた (Nakai *et al.*, *Marine Biotech*, 2011)。

(2) この研究の過程で、国内河川水の 0.2 μm 濾液から終生を極小サイズで過ごす (細胞体積は約 0.05 μm^3 で、大腸菌の約 40 分の 1)、アクチノバクテリア門の細菌を純粋培養した (Nakai *et al.*, *Antarctic Sci*, 2013; 図 1)。

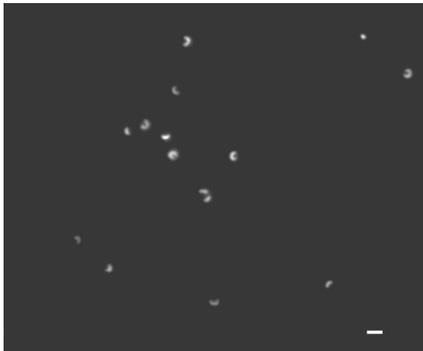


図 1. 終生を極小サイズで過ごすアクチノバクテリア門の細菌 *Aurantimicrobium minutum* (右下のスケールバーは 1 μm)

(3) 研究代表者が過去に新綱分類群として記載した濾過性細菌 *Oligoflexus tunisiensis* (Nakai *et al.*, *IJSEM*, 2014) と比較すると、本細菌は系統学的な新規性は低かった。しかし、パルスフィールド電気泳動によってそのゲノムサイズを推定したところ、約 1.6 Mbp と極めて小さく、特筆すべき特徴を持つことがわかった。なお、近縁種のゲノムサイズは約 3~4 Mbp である。

(4) 陸上と比較すると環境変動が少ない海洋では、自由生活性細菌 (独力で生きられる細菌) で最小クラスの約 1.3 Mbp のゲノムを持つ “*Candidatus Pelagibacter ubique*” が知られる。この細菌は海洋表層細菌の約 4 分の 1 を占める程に細胞集団が大きい。そして安定した環境下において自身で合成できない代謝産物を他の微生物に依存してきた結果として、ゲノムの縮小化が進んできたと考えられている (例えば Tripp *et al.*, *J Microbiol*, 2013)。

(5) 一方で、上記のアクチノバクテリア門の細菌 *A. minutum* は河川水由来である。加えて、研究代表者は氷河融水や土壌表層からもゲノムサイズの小さな濾過性細菌 (以下、ゲノム縮小候補菌) を分離している。こうした環境は一年を通して大きく変動する。これま

で取得した培養菌株は全て独力で生きられることから、自由生活性細菌のゲノム縮小は、“*Ca. P. ubique*” に見出される特殊例でなく、ある種の環境細菌のゲノムは縮小傾向にあるという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、自由生活性細菌ゲノムに生じる縮小進化の原理を解明することを目的とする。本目的を達成するため、申請者が純粋培養系を確立したゲノム縮小候補菌の一種 *A. minutum* を用いて、その全ゲノム情報解析と既知細菌ゲノムとの比較解析の 2 項目の研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 本細菌は増殖速度が遅い。ゲノム解読に十分なゲノム DNA を抽出するため、培養条件の検討と最適化を試みる。次に、得られた DNA を用いて、高速シーケンサなどによって、そのゲノム解読を行う。

(2) 得られたゲノム配列情報については、微生物ゲノムアノテーションツール MiGAP を用いて、その遺伝子機能を推定する。また、ゲノム比較解析システム MBGD を使って、本細菌と同じ系統群に所属する *Clavibacter michiganensis*、*Leifsonia xyli*、*Microbacterium testaceum*、*Sanguibacter keddieii*、*Cellulomonas flavigena*、*Cellvibrio gilvus* および *Micrococcus luteus* などのゲノム構造との比較解析を行う。また、系統は異なるものの、前述した既知のゲノム縮小細菌 “*Ca. P. ubique*” とも比較する。本解析を通じて、*A. minutum* のゲノム構造を特徴づける。

4. 研究成果

(1) ゲノム縮小候補菌 *A. minutum* の培養条件の最適化を試みた結果、Nutrient Broth や Soytone・Yeast extract をそれぞれ 1 L あたり 1 g 添加した培地を用いた場合に、良好な生育が観察された (図 2)。温度 25 °C、好気的条件下で本細菌を静置培養した。増殖特性の検討により、ゲノム解読に十分なゲノム DNA を得ることができた。なお、ゲノム抽出には QIAGEN 社の Genomic-tip を用いた。



図 2. 集菌後の菌体ペレット (本細菌は橙色を呈する)

(2) 次に、本細菌のゲノム解読を行った結果、完全なゲノム配列を取得することに成功した。推定していた通り、そのゲノムサイズは 1,622,386 bp (約 1.6 Mbp) と非常に小さかった(表 1)。このゲノムサイズは、自由生活性細菌の中では最小クラスである。

表 1. *Aurantimicrobium minutum* とその近縁種のゲノム構造

Bacterial strain	Genome size (Mb)	CDS (#)	GC (mol%)	rRNA operon (#)	tRNA (#)
<i>Aurantimicrobium minutum</i>	1.6	1543	52	1	42
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	3.2	3058	72	2	45
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	3.3	2984	72	2	45
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	2.6	2044	68	1	45
<i>Microbacterium testaceum</i>	4.0	3676	70	2	45
<i>Sanguibacter keddeii</i>	4.3	3735	72	4	45
<i>Cellulomonas fimi</i>	4.3	3762	75	3	45
<i>Cellulomonas flavigena</i>	4.1	3678	74	3	45
<i>Cellvibrio gilvus</i>	3.5	3164	74	2	45

表内の黄緑色は同じ科 (*Microbacteriaceae*) の分類群であるものを示している。

(3) ゲノム情報解析の結果によると、本細菌の特徴としてタンパク質の合成に関わる rRNA オペロンが 1 個しかないことが見いだされた(表 1)。たとえば、大腸菌ゲノムには 7 個のそれが存在する。もし一つのリボソームあたりのタンパク質合成の速度が概ね一定だとすると、細菌の増殖速度はリボソームの数によって制限される。このように、rRNA オペロンの数が本細菌の示す遅い増殖速度と関連していることが示唆された。

(4) また、比較ゲノム解析の結果として、二成分制御系やシトクロム *bd* 型呼吸系に関わる遺伝子など、近縁種のゲノムでは保存されている 231 個の遺伝子が本ゲノム中では欠落していた。この理由としては、適応価のない各種機能を失うように、ゲノム縮小が進んできたことが考えられる。

(5) 加えて、ロドプシン様の遺伝子を有することから、本細菌が光エネルギーをその増殖や生存に利用する可能性が明らかになった。なお、研究背景で記した“*Ca. P. ubique*” も

この種の遺伝子をもつことが既に知られている (*Giovannoni et al., Nature, 2005*)。

(6) 本研究により、本細菌の代謝系は驚くほど単純化ないし合理化されていることが判明した。さらに、ある種の機能を発揮するために、他の細菌が作り出す代謝産物に依存する系も見いだされた。本機構の詳細については、現在鋭意解析中である。このように、安定した環境に棲息する“*Ca. P. ubique*” などの細菌種だけではなく、環境変動の大きい他の環境でも自由生活性細菌のゲノム縮小が生じることが明確化した。

(7) 寄生や共生性の細菌におけるゲノム縮小は、宿主に遺伝子やそれに由来する代謝産物を依存した結果と考えられており、国内外の研究グループから頻りに報告されている。一方で、本研究では自由生活性の極微小生物を研究対象とした。今後も独力で生きられる細菌のゲノム縮小についてその実証的証拠を積み上げていくことで、生物の「自立的な」生存に必要な最小遺伝子セットについて新しい知見と深い洞察を与えることになると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ryosuke Nakai, Takatomo Fujisawa, Yasukazu Nakamura, Hiroyo Nishide, Ikuo Uchiyama, Tomoya Baba, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Takeshi Naganuma, Hironori Niki, Complete genome sequence of *Aurantimicrobium minutum* type strain KNC^T, a planktonic ultramicrobacterium isolated from river water, *Genome Announcements*, vol.4, pp.e00616-16, 2016. 査読有り
DOI: 10.1128/genomeA.00616-16.

中井 亮佑、小さいサイズの極限 - 生物はどこまで小さくなるのか、生物の科学 遺伝、70 巻、199 ~ 203 頁、2016. 査読無し

[学会発表](計 11 件)

中井 亮佑、超微小細菌のしなやかな生存戦略に学ぶ、第 90 回日本細菌学会総会、仙台国際センター(宮城県)、2017 年 3 月 19 日。招待講演

中井 亮佑、藤澤 貴智、中村 保一、西出 浩世、内山 郁夫、馬場 知哉、豊田 敦、藤山 秋佐夫、長沼 毅、仁木 宏典、超微小バクテリアの純粋培養とそのゲノム解析、第 31 回日本微生物生態学会大会、横須賀市文化会館(神奈川県)、2016 年 10 月 23 ~ 24 日。

中井 亮佑、仁木 宏典、超微小バクテリア

アの繁殖に関わるゲノム基盤を探る、日本遺伝学会第 88 回大会、日本大学国際関係学部（静岡県）2016 年 9 月 9 日。

中井 亮佑、水圏に遍在する超微小バクテリアの実体を知る、水圏微生物研究フォーラム 2016、東京大学大気海洋研究所(千葉県) 2016 年 8 月 9 日。

中井 亮佑、超微小バクテリアの探索とその機能解析、第 10 回細菌学若手コロッセウム、草津セミナーハウス（群馬県）2016 年 7 月 31 日。

中井 亮佑、最小の微生物は最小のゲノムを有するか？、第 3 回生態進化発生コロキウム、東京大学（東京都）2015 年 12 月 28 日。

中井 亮佑、極限環境生物の研究で求められるもの、平成 27 年度日本水産学会九州支部大会若手の会、宮崎大学（宮崎県）2015 年 11 月 7 日。招待講演

Ryosuke Nakai, Fascinating microbes in extreme environments, ISME (International Society for Microbial Ecology)-JTK (Japan-Taiwan-Korea) Joint Session, The 7th JTK International Symposium on Microbial Ecology, Tsuchiura City Kijo Plaza, Ibaraki (Japan), 2015 年 10 月 17 日。招待講演

中井 亮佑、辺境微生物ゲノムから見えてきたもの、第 9 回日本ゲノム微生物学会若手の会、八王子セミナーハウス（東京都）2015 年 9 月 30 日。招待講演

中井 亮佑、極小細菌から探る微生物の進化、日本進化学会 第 17 回大会、中央大学（東京都）2015 年 8 月 21 日。招待講演

中井 亮佑、辺境微生物たちの世界、名古屋大学アドバンス生命理学特論 / IGER セミナー、名古屋大学（愛知県）2015 年 7 月 10 日。招待講演

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/rnakai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 亮佑 (NAKAI, Ryosuke)
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員
研究者番号：90637802

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

内山 郁夫 (UCHIYAMA, Ikuo)
基礎生物学研究所・ゲノム情報研究室・助教
研究者番号：90243089

(4) 研究協力者

該当なし