

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15183

研究課題名(和文)堆積物環境に優占する未培養アーキアの分離培養と生理生態機能の解明

研究課題名(英文) Cultivation, isolation and characterization of yet-uncultivated microorganisms dominated in sedimentary environments

研究代表者

片山 泰樹 (Katayama, Taiki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：40549896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：堆積物環境に優占する未培養の微生物系統群の生理生態学的性質を明らかにし新規な分類群としての枠組みを決定するために、堆積物試料からオミクス技術を活用した培養を行った。その結果、海底堆積物を含む嫌気環境に広く分布し、かつ優占する未培養新門Atribacteriaの純粋培養に成功した。本分離株RT761株は、絶対嫌気性の発酵細菌で水素利用性メタン生成アーキアと共生関係を持つ。RT761株は細胞を覆う外膜及び内膜に加えて細胞内膜を有し、ゲノムDNA及びRNAを隔離していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RT761株の帰属する新門候補Atribacteriaは、堆積物環境での優占性から生態学的に着目されていたが、1998年に遺伝子として発見されてから約20年間一度も培養例がなかった。本研究にて世界で初めて純粋培養に成功し、その実体が明らかとなった。また、原核生物では最も高次の分類階級「門」レベルで新規な菌であり、分類・進化的にも重要な発見となった。特に、原核細胞の定義を覆す核様体を包む膜の存在は、細胞生物学にも非常に興味深い発見であり、大きな波及効果をもたらす。

研究成果の概要(英文)：Most of microorganisms abundant in sedimentary environments are uncultured. To determine their physiological and ecological roles and accurate taxonomic positions, sediment and formation water samples were cultured based on the findings from omics analysis. We successfully isolated a bacterium, strain RT761, belonging to the yet-to-be-cultured candidate phylum 'Ca. Atribacteria' (formerly called OP9) that are ubiquitous and abundant in anoxic environments favoring fermentation and syntrophy. RT761 is an obligatory anaerobic gram-negative bacterium that compartmentalizes its nucleoid in an intracytoplasmic membrane unlinked to the cell wall. RT761 primarily produces hydrogen for electron disposal during sugar degradation and its growth is improved by co-cultivation with a hydrogen-scavenging methanogen.

研究分野：微生物生理生態学

キーワード：堆積物環境 メタン生成アーキア 共生 新門 分離培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物群集(ここではバクテリアとアーキアを指す)の大部分は、現時点で培養法が不明な系統群によって占められており、それらの生理・生態は未知である。近年では、遺伝子配列解読技術の発展によって、培養を介さずに環境の未知微生物種のゲノムを再構築し、生理代謝機能を推定することが可能となった。しかし、これらの解析は既知データベースに基づくため、新規な表現型の特定に結びつけることは困難である。人工的な培養環境で微生物を培養し、生理・生化学性状、及び遺伝学的特徴を明らかにすることは、微生物多様性の体系的な理解と生態学的な役割の解明に必要不可欠である。

研究当初対象とした微生物は、1990年代後半に環境からリボソーム RNA 遺伝子として発見されて以来一度も培養例の報告のない未培養アーキアである。培養を介さない遺伝子解析によるこれまでの研究において、堆積物環境における広汎かつ優占的な系統群であることから、生態学的重要性が示唆されてきた。当該系統群以外にも、堆積物環境には群集の中で優占しながらも未だ培養例がなく実態が不明な系統群はバクテリア、アーキア問わず数多く存在している。

2. 研究の目的

本研究では、既に集積培養に成功した当該アーキアの培養物を用いて、バイオインフォマティクス技術解析に基づく代謝機能の推定を行い、当該系統群のみならず、培養に含まれる様々な新規な系統群の分離培養を試みる。純粋培養後は、形態・生理・遺伝学的な性質を解明し、新規の学名記載種として提案・登録する。新規な系統群を特徴付ける性質を決定し、分類群としての枠組みを構築する。

3. 研究の方法

(1) メタゲノム・メタトランスクリプトーム

解析集積培養物中の主な種の代謝機能を推定するために、培養物から全DNA及びRNAを抽出し、それぞれイルミナ社 Miseq 及び HiSeq シーケンサーを用いて塩基配列を解読した。出力されたDNA配列データについて、Trimmomatic ソフトウェアを用いてクオリティフィルタリングを行い、SPAdes ソフトウェアを用いてアセンブルを行い、MaxBin ソフトウェアを用いてビンニングを行い、Prokka や eggNOG-mapper を用いてアノテーションを行うことで培養系に存在する微生物種のゲノムの再構築を行った。RNA配列データについては、Trimmomatic ソフトウェアを用いてクオリティフィルタリングを行い、salmon ソフトウェアを用いて前述の再構築ゲノム配列にマッピングして、各遺伝子の発現量を Transcripts Per Kilobase Million (TPM) 値を計算した。

(2) Stable isotope probing 法を用いた脂質分析

上記にて推定した代謝経路から目的微生物が利用する可能性のある基質について、¹³C 同位体で標識した基質を添加して培養を行い、培養後の脂質を分析した。遠心分離にて回収した培養菌体から Bligh&Dyer 法を用いて脂質を抽出し、ヨウ化水素にてエーテル結合を切断したイソプレノイド鎖を GC-MS 及び GC-IRMS を用いて脂質同定・同位体比分析を行った。

(3) 単離株を特徴付けるための培養試験

集積培養物から単離されたバクテリアについて、ゲノム配列解析、生理学的諸性質の決定、細胞形態の特定を行った。後者については、位相差顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡を用いた細胞観察を行った。

4. 研究成果

集積培養から 12 個の Metagenome-assembled genomes が再構築された。目的とするアーキア(bin001)は、completeness が 99%以上、コンティグ数が 5 と非常に高品質なゲノム配列データが得られた。

このゲノム配列及び遺伝子発現解析から acetogenesis が中枢代謝であることが推定され、Stable isotope probing 法による脂質分析においてもその経路の存在が示唆された。これらの情報に基づいて更なる集積培養を行い、ターゲットとなるアーキアとバクテリア 1 種のみが存在する培養系の構築に成功した。今後更なる純化を行い、純粋培養株の獲得を試みる。

上記の培養の過程において、新種のバクテリア(以下 RT761 株)を単離した。RT761 株は絶対嫌気性の糖発酵細菌で、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析では新門候補 Atribacteria に所属した(図1)。Atribacteria は 1998 年にイエローストーン国立公園の温泉から 16S rRNA 遺伝子クローンとして発見され OP9 と命名されて以来一度も培養例のない。また、原核生物の分類階級では最も高位の「門」レベルで新規な未培養系統群である。更に、図1に示すように Atribacteria は、嫌気消化槽、湖沼・海底堆積物、温泉、油田など様々な嫌気環境から広汎に遺伝子クローンとして検出されており、特に、本研究の対象となる海底堆積物では最も優占的な系統群の 1 つである。本研究にて世界で初めて Atribacteria に帰属する細菌の純粋培養に成功した。

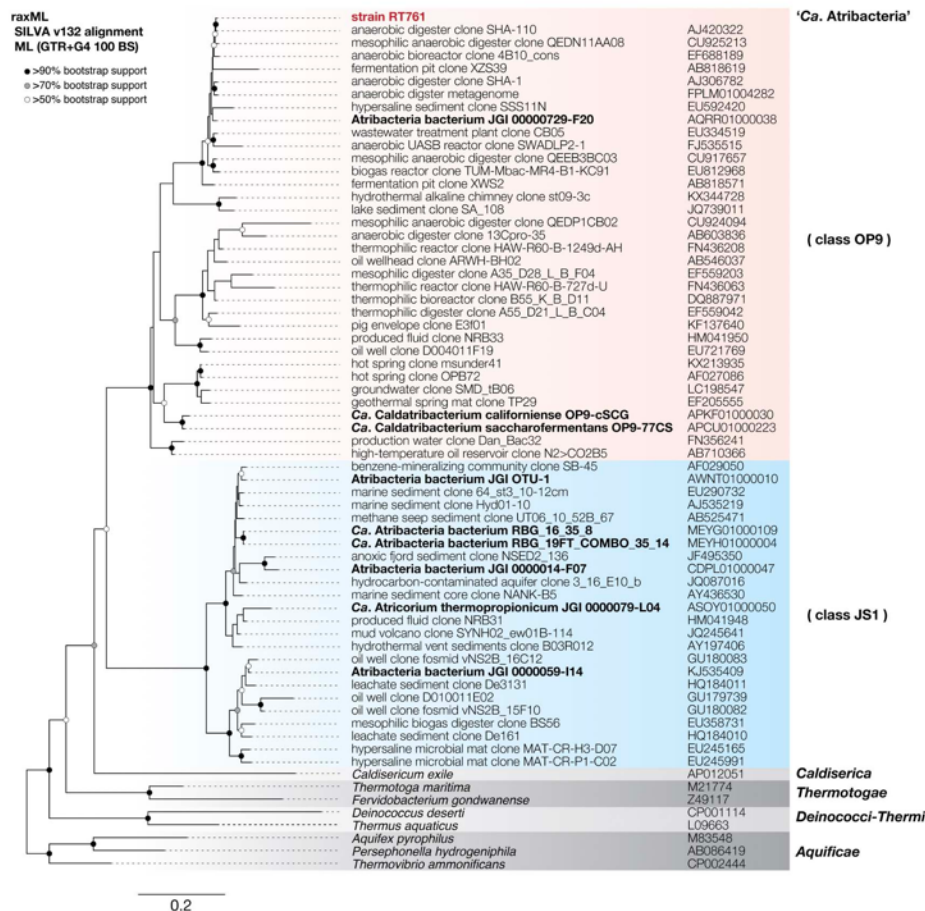


図1 16S rRNA 遺伝子に基づく RT761 株の分子系統樹 RT761 株を赤字、環境から再構築されたゲノムを黒太字で示した。

RT761 株細胞は桿状と卵状の中間的な形態をしており両端が尖っていた (図2 a-c)。驚くべきことに、細胞の超薄切片の観察では、グラム陰性菌と同じ外膜(OM)と内膜(CM)に加えて、細胞内膜(ICM)が核様体(N)を完全に覆うように観察された (図2 c-f)。実際、蛍光顕微鏡観察ではDNAの細胞内局在性が観察された (図3)。これは、ゲノムDNAを包む細胞膜を持たないとする原核生物の定義を覆す発見である。これまで *Planctomycetes* 門のバクテリア *Gemmata obscuriglobus* が、RT761 株と同様に核様体を包む細胞内膜を有すると言われていたが、近年の研究にて *G. obscuriglobus* の細胞膜は内膜(CM)であることが判明した(Boedeker et al, Nat Commun, 2017)。

ICMは細胞分裂のどの段階でも観察され、同時に核様体の局在性も確認された。蛍光顕微鏡では、DNAだけでなくRNAもICM内部に局在していることが観察された。一方で、リボゾーム様particleはICMの内側(IFS)と外側(CBS)のどちらにも観察された。DNA複製、RNAへの転写、タンパク質への発現が物理的に区切られた細胞内空間で為されているとすれば、これまでの原核生物には無い、進化的に見て非常に興味深い現象であるため、今後検証していきたい。

RT761 株の全ゲノム配列を解読したところ、全長約3.1 Mb、GC含量38.7%、CDS(タンパク質コード領域)は2,760個であった。TMHMMソフトウェアを用いて予測した膜タンパク質について全タンパク質における割合は29.6%であった。これを他のグラム陰性菌と比較したところ、全ゲノム配列が決定されているグラム陰性菌3,920株中12位と非常に高いランクを示し、3つの膜を有するRT761株において膜タンパク質の重要性が示唆された。興味深いことに、この割合がRT761株よりも多いグラム陰性菌のほとんどは特徴的な鞘構造と呼ばれる外膜構造を有するThermotogae門に帰属する細菌であったことから、特殊な膜構造を持つ細菌は膜タンパク質が多いという共通点が見出された。

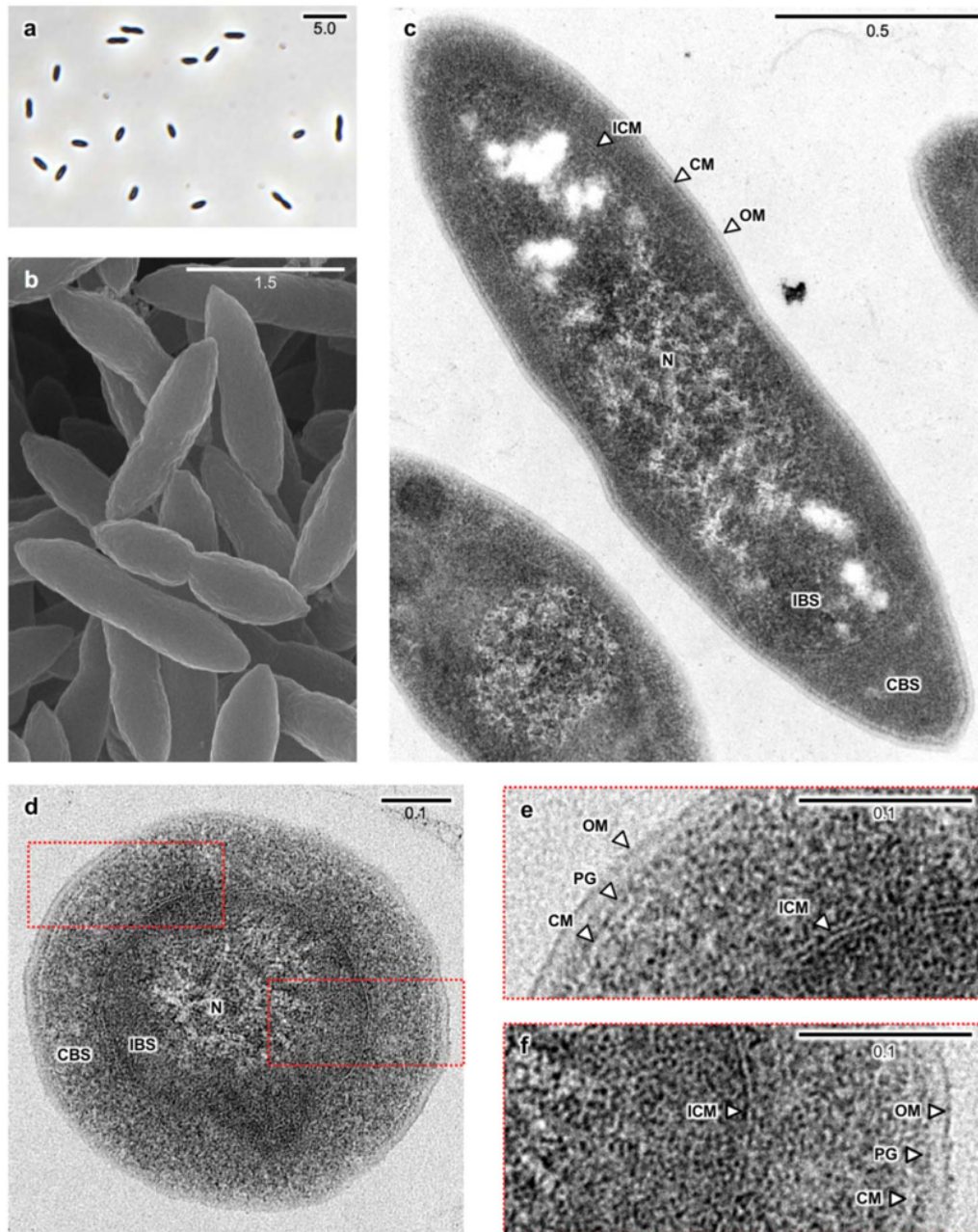


図2 顕微鏡観察による RT761 株細胞の形態と構造 (a) 位相差顕微鏡写真。(b) 走査電子顕微鏡写真。(c-f) 透過電子顕微鏡による超薄切片写真。スケールバーの単位は μm 。OM, outer membrane; PG, peptidoglycan; CM, cytoplasmic membrane; ICM, intracytoplasmic membrane; CBS, CM-bounded space; IBS, ICM-bounded space; N, nucleoid.

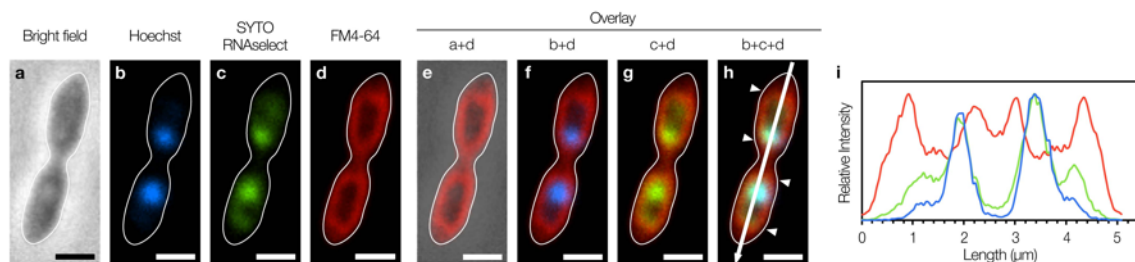


図3 蛍光顕微鏡観察による RT761 株細胞におけるゲノム DNA と RNA の局在性 (a-h) 共焦点レーザー顕微鏡写真。Hoechst は DNA を、SYTO RNaselect は RNA を、FM4-64 は膜脂質を染色する。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ 。(i) 写真(h)に図示した矢印に沿った蛍光強度プロファイル。FM4-64 のピークの位置をアローヘッドで(h)に示した。細胞内部が FM4-64 で強く染まった様子は、細胞内膜の存在と位置を示唆しており、その内部にのみ DNA 及び RNA が染色されている。

RT761 株ゲノムの 34 個のタンパク質は N 末端に 10-73 アミノ酸残基が余分に存在することが明らかとなり (以下、N-terminal extensions; NTE) (NCBI RefSeq database で上位 250 まで Blast ヒットなし)、そのうちのいくつかは、他の Atribacteria に帰属するゲノム (環境から直接再構築されたもの) にも保存されていた。この中には、生命現象の根本に関与するタンパク質、例えば、DNA 複製、DNA 修復、転写制御、細胞分裂などが含まれており、RT 株のみならず Atribacteria の生理現象において重要な役割を担う可能性が推察された。この中で細胞分裂時に働く FtsZ には、Atribacteria 間に共通して NTE を持つ FtsZ と NTE を持たない FtsZ が存在することが判明した (図 4)。FtsZ を 2 コピー以上持つ原核生物は他にも知られているが、NTE を持つものはいない。FtsZ の NTE について Atribacteria 間で保存されている領域は、両親媒性の α -ヘリックス構造を持つことが推定された (図 4b)。通常、FtsZ は両親媒性の α -ヘリックス構造を持たず、当該構造を C 末端に持つ FtsA と複合体を形成することで脂質膜に付き、細胞分裂が行われる。しかし、理論的には Atribacteria の NTE 有り FtsZ は FtsA がなくとも脂質膜に付くことが可能である。調和的に、NTE 無しの FtsZ はゲノム上に FtsA と並んで存在しているが、NTE 有りの FtsZ は単独で存在した。以上のことから、NTE 有りの FtsZ は通常の細菌とは異なる働きを持ち、3 つの膜を持つ RT761 株の細胞分裂に重要な役割を担うことが推察された。

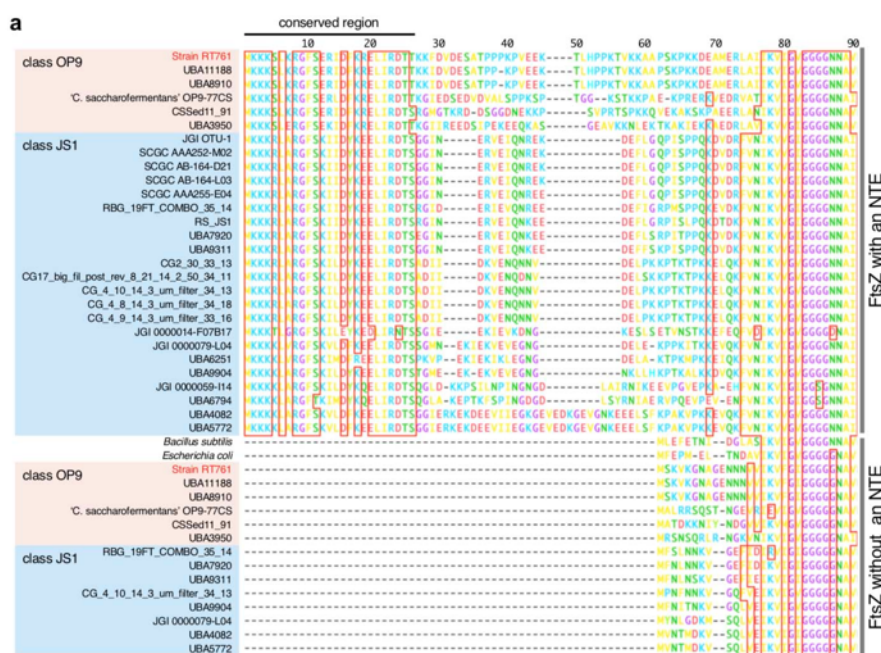


図 4 Atribacteria における細胞分裂タンパク質 FtsZ の特徴 (a) NTE を持つ FtsZ と NTE を持たない FtsZ のアミノ酸配列比較。(b) NTE の保存領域 α -ヘリックス構造のヘリカルホイール図。親水性アミノ酸を黄色、疎水性アミノ酸を水色で示した。

RT761 株はグルコース等の単糖を資化して水素、酢酸、二酸化炭素とごく微量のエタノールを産生する発酵細菌であった。培養瓶の気相に蓄積する水素によって増殖が阻害されるが、水素利用性メタン生成アーキアと共生培養させると、増殖率と最大細胞密度が飛躍的に増加した。これは、種間水素伝達と言って、RT761 株が産生する水素をメタン生成アーキアが除去してくれることで、RT761 株が酢酸生成 (つまり ATP 生成) に注力できるからと説明できる。一般的に発酵細菌は、水素生成以外の電子の捨て場として有機酸やアルコールを生産するが、RT761 株はエタノールをほとんど生産しない。このことから、RT761 株は細胞内レドックスバランスの保持において水素生成以外の手段を持たないことが示唆された。従って、一般的な発酵細菌とは異なり、RT761 株が理想的な増殖を行うためには水素利用性メタン生成アーキアとの共生が必要不可欠と言える。RT761 株はエネルギー代謝を担うタンパク質複合体として、一般的な発酵細菌が持つ NiFe hydrogenase や Formate dehydrogenase は持たず、絶対共生細菌が持つことが知られている NADH:Fd oxidoreductase (Rnf) や FeFe hydrogenase を有していた。以上の結果から、RT761 株は一般的な発酵細菌よりも寧ろ、共生細菌に近い性質を持つと言える。この RT761 株の代謝的な性質は、帰属する Atribacteria が発酵やメタン生成アーキアとの共生が成立し易い嫌気環境に広く分布していることと正に調和的であった。環境から構築された Atribacteria のゲノムからは、RT761 株と同様な発酵代謝 (水素生成) や、水素利用性メタン生成アーキアが必要不可欠な共生的脂肪酸酸化能を担う遺伝子が発見されており、共生代謝が Atribacteria 門の共通的な性質なのかもしれない。他の生理学的性質を解明し、公的菌株保存機関への登録、ならびに、学名記載種として登録を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katayama Taiki, Yoshioka Hideyoshi, Yamanaka Toshiro, Takeuchi Mio, Muramoto Yoshiyuki, Usami Jun, Ikeda Hidefumi, Sakata Susumu	4. 巻 127
2. 論文標題 Microbial community structure in deep natural gas-bearing aquifers subjected to sulfate-containing fluid injection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 45 ~ 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.06.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Taiki, Nobu Masaru K., Kusada Hiroyuki, Meng Xian-Ying, Yoshioka Hideyoshi, Kamagata Yoichi, Tamaki Hideyuki	4. 巻 無
2. 論文標題 Membrane-bounded nucleoid discovered in a cultivated bacterium of the candidate phylum 'Atribacteria'	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 無
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/728279	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	延 優 (Nobu Masaru)	産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門	
研究協力者	玉木 秀幸 (Tamaki Hideyuki)	産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門	