

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14777

研究課題名(和文)メタン酸化酵素遺伝子を有する未培養微生物の網羅的系統分類とrRNAアプローチ

研究課題名(英文)Phylogeny of uncultured bacteria possessing pmoA gene and rRNA approach

研究代表者

松浦 哲久(Matsuura, Norihisa)

金沢大学・地球社会基盤学系・助教

研究者番号：90771585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンプリコンPCRベースで16S rRNA遺伝子と機能遺伝子をリンクづけて解析する技術の開発を行い、環境サンプルに存在する未培養メタン酸化細菌の系統を明らかにすることを目的とした。純粋菌株を用いた実験では、エマルジョンを用いた遺伝子結合PCRを実施し、その精度を評価した。環境サンプルの調査では、土壌サンプルにおいて未培養メタン酸化細菌の割合が多いことがわかった。遺伝子結合PCRをそのサンプルへ適用し、1種類の未培養メタン酸化細菌の系統(16S rRNA遺伝子)を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温室効果ガスであるメタンは地球上の至るところから発生している。一方で、メタンを温室効果ポテンシャルの低い二酸化炭素に変換する微生物(メタン酸化細菌)も地球上に数多く存在する。このメタン酸化細菌の多くは未知微生物として知られている。本研究では、これらの微生物を検出し、その生態系を解明することを目的としている。本研究の成果は、未知微生物の生態を明らかにし、地球上の未だ不明なメタン循環の理解に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We developed an emulsion fusion PCR to link between 16S rRNA gene and functional gene. The fusion PCR was evaluated using a pure cultures experiment. And an uncultured methanotroph is discovered in forest soils as high population. We applied the developed tool to the sample and determined the phylogeny of the uncultured methanotroph.

研究分野：微生物生態学、環境工学

キーワード：16S rRNA遺伝子 pmoA遺伝子 メタン酸化細菌 遺伝子結合PCR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原核微生物の生理学的機能と分子系統分類は基本的かつ重要な情報であるにも関わらず、分離培養やゲノム解析などを介さないと、その両者を関連付けて把握することはできない。しかしながら、大規模メタゲノム解析のコストが高い、分離培養が困難などといった問題がある。そのため、微生物の分子系統分類と生理学的機能を容易に解析する技術の開発が求められている。生理学的機能と分子系統分類を把握すべき微生物のひとつにメタン酸化細菌がある。メタン酸化細菌は、メタン酸化酵素遺伝子 (*pmoA* 遺伝子) を保有しているが、その系統が明らかでない種が多く存在している。したがって、このメタン酸化細菌の系統分類を明らかにすることは、地球上のメタン循環の解明に重要である。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、生理学的機能と分子系統分類を容易かつ網羅的に解析するために、機能遺伝子と系統 (16S rRNA 遺伝子) を結びつけるアイディアの創成を行ってきた。そこで本研究では、純粋菌株を用いて開発技術の検証を行い、本技術を環境サンプルに適応し、未培養メタン酸化細菌の系統を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 純粋菌株の準備

実験にはメタン酸化細菌 (*Methylomonas*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*) を用いた。それぞれの純粋細菌を所定の培地で培養した。顕微鏡を用いて培養した微生物の菌数カウントを行った後、それぞれを均等数に混合した。標的遺伝子はそれぞれの細菌の 16S rRNA 遺伝子と *pmoA* 遺伝子とした。

#### 3.2 エマルジョン PCR

シングルセルで実施するために、エマルジョン PCR の検討を行った。ドロップレットの作成にはバイオラッド社の ddPCR エマルジョンオイルと ddPCR バッファーを用いた (Biorad)。DNA ポリメラーゼは AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼを用いた (ThermoFisher Scientific)。16S rRNA 遺伝子をターゲットしたプライマーは EUB338F/515R を用い、*pmoA* 遺伝子をターゲットとしたプライマーは 189F/682R を用いた。16S rRNA 遺伝子の 515R と *pmoA* 遺伝子の 189F の 5'末端には 20 塩基程度のリンカーを付加した。PCR 条件は、95°C で 5 分間熱変性を行なった後、94°C : 30 秒、55°C : 30 秒、72°C : 60 秒を 50 サイクル実施し、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を実施した。エマルジョンから PCR 産物の回収にはクロロホルムでエマルジョンブレイクを用い、フェノールクロロホルム法によって精製を行った。

#### 3.3 環境サンプルの解析

15 箇所の環境から微生物のサンプルリングを行った。サンプルを 1×PBS で洗浄し、遠心分離 (10,000g、5 分、室温) した後、約 0.20g の微生物ペレットを DNA 抽出用のサンプルとした。DNA の抽出には、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用し、抽出方法は付属のマニュアルに従った。

16S rRNA 遺伝子 V3 領域および *pmoA* 遺伝子アンプリコンシーケンス用のライブラリーは、2 ステップ PCR プロトコルを使用して調製した。1st PCR には、AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼを用いた (ThermoFisher Scientific)。16S rRNA 遺伝子をターゲットしたプライマーは EUB338F/515R を用い、*pmoA* 遺伝子をターゲットとしたプライマーは 189F/682R を用いた。PCR 条件は、それぞれ 95°C で 5 分間熱変性を行なった後、94°C : 30 秒、55°C : 30 秒、72°C : 60 秒を 25-30 サイクル実施し、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を実施した。1st PCR 産物は、AMPure XP で精製した。2nd PCR には、1×KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche) と 300 nM の i5 および i7 Nextera XT index adapters (Illumina) を用いて行った。PCR 条件は、95°C で 3 分間熱変性を行なった後、98°C : 20 秒、60°C : 15 秒、72°C : 60 秒を 8 サイクル実施し、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を実施した。2nd PCR 産物を AMPure XP で精製し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を使用して定量した。調製したライブラリーは、Illumina MiSeq (Illumina) にて配列決定した。

読み取られた配列の生データは、Trimmomatic でクオリティコントロールを行い (Bolger et al., 2014)、Cutadapt でプライマー配列を除去した (<https://omictools.com/cutadapt-tool>)、USEARCH v9 によって (Edgar, 2013)、リード 1 とリード 2 のマージを行った。QIIME v1.9 を用いて各リードを 97% の配列相同性でクラスタリングした (Caporaso et al., 2010)。クラスタリングされた各 OTU は、Greengene database v13\_5 を用いて種の同定を行った。*pmoA* 遺伝子も同様に各リードを 98% の配列相同性でクラスタリングを行い、クラスタリングされた各 OTU は、*pmoA* データベースを使用して種の同定を行った (Dumont et al., 2014)。

#### 4. 研究成果

##### 4.1 エマルジョン PCR による遺伝子結合率

ポアソン分布に基づき、 $\lambda$  値が 2.0、0.5、0.1 になるように混合したメタン酸化細菌の濃度を調整した。理論的な正しい遺伝子結合率は、それぞれ、44% ( $\lambda=2.0$ )、84% ( $\lambda=0.5$ )、96% ( $\lambda=0.1$ ) となる。その濃度に準じて、エマルジョン遺伝子結合 PCR を実施したところ、正しい遺伝子結合率は、それぞれ 44%、52%、78% であった。濃度が低くなるにつれて、結合率は上昇したものの、理論値と若干離れていた。微生物の分散が十分でなく、1つのエマルジョンに複数の異なる種のメタン酸化細菌が入っていたこと、一部のエマルジョンが崩壊したためと考えられた。

##### 4.2 環境サンプルの解析

15箇所の環境からメタン酸化細菌の検出を行った結果を図1に示す。サンプルに含まれるメタン酸化細菌の多くは、未培養クラスターに属した。中でも USCa と AOB-like クラスターに属することがわかった。USCa クラスターに属するメタン酸化細菌に着目すると、土壌サンプルでその割合は最大 95% であった。一方で、少数ながら、*Methylocystis* に属するサンプルも見られた。この結果を元に、最も USCa クラスターに属するメタン酸化細菌が豊富な土壌サンプルを次の実験に用いた。

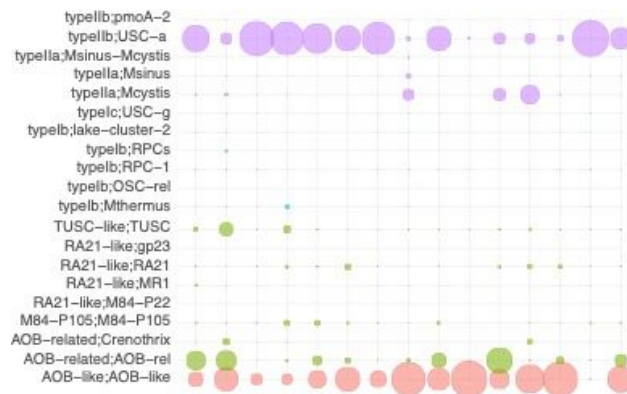


図1 15箇所の環境から検出したメタン酸化細菌群

##### 4.3 環境サンプルを用いた 16S rRNA 遺伝子の回収

USCa クラスターが最も豊富なサンプルを用いてドロップレット遺伝子結合 PCR を行った。通常の PCR 容量では、十分回収量が得られなかったため、PCR 容量を 10 倍にして行った。その結果、環境サンプルから、目的の遺伝子断片を確認することができた。回収遺伝子断片の 16S rRNA 遺伝子を解析し、その微生物種の存在割合とアンプリコン解析から得られた 16S rRNA 遺伝子の存在割合の相関を取った(図2)。OTU431460 の種は、環境サンプルには約 1% 存在し、ドロップレット遺伝子結合 PCR によって *pmoA* 遺伝子とリンクした割合は約 20% であった。検出された 16S rRNA 遺伝子は、*Alphaproteobacteria* に分類された。したがって、この種は *pmoA* 遺伝子を有している可能性が非常に高いことがわかった。

今後は、サンプルのゲノム解析を実施し、本開発技術が目的の微生物から 16S rRNA 遺伝子を回収できているか確認する。

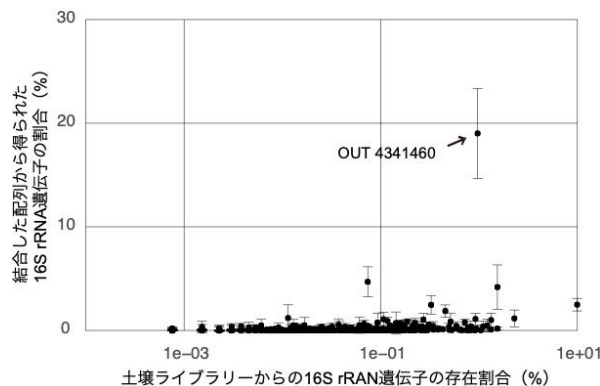


図2 ドロップレット遺伝子結合 PCR から得られた 16S rRNA 遺伝子の存在割合とアンプリコン解析から得られた 16S rRNA 遺伝子の存在割合との関係

## 参考文献

- Edgar RC (2013) UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads. *Nat. Methods*, 10 (10): 996–998.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* 7: 335–336.
- Dumont MG, Lüke C, Deng Y, Frenzel P (2014) Classification of pmoA amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN. *Front. Microbiol.* 5: 34

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 MonychotTepy Chanto, Noriko Tomioka, Kazuaki Syutsubo, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Norihisa Matsuura
2. 発表標題 Microbial Community and Abundance in Municipal Wastewater Treatment Plant by 16S rRNA Gene Sequencing
3. 学会等名 Water and Environment technology Conference (WET) (2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyoshi Koike, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Yoshihito Nakahara, Hiroya Kodera, Norihisa Matsuura
2. 発表標題 Microbial Community Analysis in the Bioreactor Treating Methane / Ammonia Contaminated Groundwater
3. 学会等名 The 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------