

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22293

研究課題名(和文)シトクロムオキシダーゼの分布に着目した未知細菌門の発掘

研究課題名(英文)Mining unknown bacterial phylum based on the distribution of cytochrome oxidase

研究代表者

上田 賢志(UEDA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00277401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、Firmicutes門の嫌気性バクテリアに、好気呼吸を司る酵素シトクロムオキシダーゼ(Cco)を保有する菌が4つ存在する。これらの菌群はFirmicutesとは独立した門に属するが、構成員の情報が乏しく実態が明らかになっていないと考えられた。未知門に含まれる菌群を分離することを試みた結果、*Caldinitratiruptor microaerophilus*が低酸素濃度下で増殖しCco活性を示すこと、DGGE法による菌相解析ならびに16S rRNA遺伝子の全長アンプリコン解析の結果から海洋性試料のうち特にカキの殻から目的の分類群に含まれることが期待される菌群が培養されることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物はその多くが未だ分離培養されていないことは、今では定説として広く知られている。しかし、そうした菌群が何故培養できないのか、また既知の菌とどのように異なる性質を示すのかなどについての知見は得られていない。本研究で対象とする菌群はまさにそうした菌の一部に相当し、それらの生態ならびに分類的特性を明らかにすることは、生物多様性に関する理解を大いに深めることにつながる。さらに、酸素を利用した呼吸が進化の過程でどのようにして生物界に広まったかに関するこれまでに無い知見をもたらすことから、生物進化のミッシングリンクを紐解く鍵になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Currently, there are four bacteria retaining cytochrome oxidase (Cco), the enzyme involved in aerobic respiration, in the phylum Firmicutes. Probably, these bacteria affiliates with a phylum diverged from Firmicutes whose feature has not yet elucidated due to the lack of information regarding the bacteria affiliating to the taxon. This study was carried out to clarify the presence of the hitherto unidentified phylum. Based on the hypothesis that a bacterium that has been identified under the name *Caldinitratiruptor microaerophilus* affiliates the unknown taxon, the bacterium was studied for its respiratory enzymes and shown for the occurrence Cco activity. DGGE and 16S rRNA gene amplicon sequencing analyses demonstrated that bacteria expected for its affiliation with the unknown taxon are cultured from marine samples including oyster shells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：グラム陽性細菌 Firmicutes門 新門 シトクロムオキシダーゼ 微生物探索

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、共生細菌 *Symbiobacterium* を主な材料とする微生物間の相互作用に着目した研究を通じて、相互作用に介在する因子とその作用の多様性を明らかにするとともに、それらがいかに生態系の構築に関わるかについて、ならびにその進化的背景に関する洞察を深めてきた。*Symbiobacterium* は、堆肥から共に分離された *Geobacillus* と共培養することではじめて良好に増殖する、微生物間の共生に依存する菌として同定された。我々は、その増殖を支持する要因を調査し、主たる因子が CO₂ の供給であること、また酸素の消費を含む増殖阻害因子の除去も *Geobacillus* が果たす役割であることを見いだした。分離培養が困難な本菌は分類学的にも他にない性質を示すが、一方で、環境中に普遍的に存在していることも明らかになった。

我々は、CO₂ の他にも光照射によって一般細菌の遺伝子発現が誘発される現象や、一部の菌が合成するシデロフォアが鉄イオンの供給源として合成能を持たない菌にも利用されること、抗生物質がその低い濃度では異なる作用を持ち、共生因子として作用するものがある可能性を示してきた。上述の共生相互作用には、それぞれ特定の酵素や代謝産物の機能が深く関与している。我々は、それらの生成に必要な遺伝子についてゲノムデータベースを調査することで、その生態学的ならびに進化的な広がりや意義についての考察も行ってきた。たとえば、CO₂ についてはカルボニックアンヒドラーゼをコードする遺伝子群が、光については *litR* 相同遺伝子群が、鉄シデロフォアについてはその生合成遺伝子と同時に取り込みに関与する遺伝子がそれぞれの環境因子の利用性・応答性に関与する。これらの遺伝子のゲノムデータベース中における分布を検索すると、いずれについてもそれを保有する菌としない菌が存在することが明確に観察された。これはすなわち、双方のタイプの菌群の間における補完や競合によって微生物コミュニティが形成されていることを物語ると同時に、微生物生態系の構造と構築をゲノム進化の観点から理解する研究アプローチが有効であることを示している。

本研究がめがける新門の存在についての推論は、前述の *Symbiobacterium* のユニークな特性に関する多面的な検証の成果が基になっている。本菌はもともと、工業利用を目的とした耐熱性トリプトファナーゼのスクリーニングにおいて陽性株として取得されたもので、その後の観察から、単独では増殖しないが、同じ培養液に含まれていた *Geobacillus* と混合培養すると良好に増殖する性質を示すことが判明した。従来手法では分離できないことから、既存の微生物学には記述されていないような特性を有することが期待され、以降、独創的な研究のモデルとして我々らの研究において中心的に取り扱われることになった。

本菌は、16S rRNA 遺伝子を指標にした系統分類では曖昧ながら *Firmicutes* に含まれる系統枝を形成し、全ゲノム情報からは内生孢子形成に関与する一連の *spo* 遺伝子が存在すること、それ以外の蛋白質も *Clostridia* に相同性が高いものが多く見つかること、嫌氣的な培養条件が増殖に適していることから、*Clostridia* 綱に新たに設立された *Symbiobacteriaceae* 科の一属として扱われている。しかし、我々が2004年に全ゲノムを決定し報告した時点で、*Clostridia* には存在しないはずの酸素を利用する呼吸酵素である cytochrome oxidase (Cco) を構成する蛋白質がフルセットでオペロンを形成していることが観察されていた (Nucleic Acids Res 32:4937)。また、G+C 含量が高い (68%) ことも *Clostridia* としては考えにくい性質であった。

その後、類似の性質を示す前述の4属が同定され、いずれも高温性でかつ高いゲノム G+C 含量を示し、代表株のゲノム解読の結果、いずれも Cc0 を保有することが判明した。そして、これらの全てを含めた 16S rRNA 遺伝子の系統樹は、これら5属がまとまって *Firmicutes* から独立したクラスターを形成することが明らかとなった。これらを踏まえ、現在までに分離培養が困難なために見過ごされている未知の細菌門が存在し、そこには、これまでにない特性を併せ持った菌群が含まれていると予想するに至った。

2. 研究の目的

生物は3つの超界(バクテリア・アーケア・ユーカリア)に分類される。バクテリアは複数のグループに分けられ、そのうち *Terabacteria* と呼ばれるグループには現在、9つの門が存在する。それらのうち、いわゆるグラム陽性の低 G+C 含量グループとして捉えられてきた *Firmicutes* 門は、嫌気性の2綱(*Clostridia* と *Lactobacilli*) と好気性の *Bacilli* 綱から構成されている。我々はそれから独立した未知の門が存在していることを予想した。

予想の根拠は、我々が研究対象としてきた *Symbiobacterium thermophilum* と、その後に見出された4属(*Thermaerobacter*, *Sulfobacillus*, '*Caldinitratiruptor*' および *Limnochorda*) にある。これらはいずれも *Firmicutes* に含まれているが、16S rRNA 遺伝子の系統樹で *Firmicutes* から独立したクラスターを形成すること(渡邊ら. IJSEM 65:2378, 2015)、ゲノム DNA の G+C 含量が高いこと、さらに、我々が行ったゲノムデータ解析の結果、いずれもシトクロムオキシダーゼ(Cc0)複合体を有することが判明したことから、これらは *Firmicutes* とは異なる分類群に属することが推測される。おそらく、分離培養が困難であるために見過ごされている菌群の一つであると推測される。

Cc0 は酸素分子を電子受容体とする好気呼吸に必要な末端呼吸酵素であり、好気性菌に分布するが、嫌気性の *Clostridia* や乳酸菌群には全く存在しない。上記の5属は、*Thermaerobacter* 以外はいずれも通性嫌気性であり、酸素がない方が増殖に適しているにも関わらず、Cc0 の2つのタイプを不足なく保有している。すなわち、これらは未知細菌門の存在を強く示唆することに加えて、地球大気酸素濃度の増加に伴って酸素を還元して解毒、さらにそれを呼吸に利用するようになった劇的な生物進化の歴史に重要な情報をもたらす分類群である可能性が高い。

そこで、本研究では、現在のグラム陽性細菌の系統分類群に、嫌気性と好気性の間にまたがる新たな門(New Phylum)が存在することを実証する。その達成のために、低酸素条件に適応していると推測される当該門に属する難培養性菌群を分離培養する技術を確立し、それを用いて証拠となる菌群を単離、それらの生理的および遺伝的特性に関する情報を取得する。

3. 研究の方法

(1) 菌株および分離源 *Caldinitratiruptor microaerophilus* JCM16183 は理化学研究所 JCM より分譲を受けた。菌株の分離源には、牡蠣殻を主とする海洋試料を用いた。

(2) 培養 *C. microaerophilus* および環境試料からの探索は共に主に長試験管を用いて 60 °C で 3-7 日間静置することで行った。*C. microaerophilus* の培養は既報(Fardiau et al. Extremophiles 14:241, 2010)に記載の培地ならびに嫌気条件によって行った。探索培養は、主に LB 培地(pH8.0)を用いた。このときの培養は、長試験管の上部まで培地を入れてシリコン栓で蓋をした状態に分離源を投入し、60 °C で 3-7 日間静置することで行った。トリ

プトファナーゼ活性検定などは以前の記述に記載 (Sugihara et al. Biosci Biotechnol Biochem. 72:204, 2008) の通りに実施した。

(3) DNA 取り扱い 細胞からの DNA 抽出はリゾチーム - SDS を用いた標準的なマニュアル手法を用いて実施した。濃度測定は NANO DROP LITE (Thermo Scientific) を用いて行った。そのほか、アガロース電気泳動をはじめ、標準的な手法を用いた。

(4) DGGE 法 DGGE (Denatured gradient gel electrophoresis) は以前の記載 (Sugihara et al. J Gen Appl Microbiol. 53:363, 2007) と同様の方法によって実施した。マーカーには DGGE Marker (NIPPON Genetics Co) を用いた。

(5) メタ 16S rRNA 遺伝子解析 蛎殻から得られた数点の培養液から抽出した DNA を鋳型にユニバーサルプライマー (27F, 5' -AGAGTTTGATCCTGGC-3' ; 1492R, 5' -GGTTACCTGTACGA-3') を用いて PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子の増幅断片の集合体について、ナノポア社の一分子解析シーケンサー GridION を用いた全長アンブリコンシーケンス解析を行った。解析は(株)生物技研に委託した。

4 . 研究成果

(1) *C. microaerophilus* のゲノム解読

2010 年に Fardeau ら (Extremophiles 14:241, 2010) がフランスの温泉から単離した *C. microaerophilus* は、その 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹において上記の *Symbiobacterium* と近接した枝を形成することがわかっている。本菌は、高温菌 (至適温度 65) でかつ高い G+C 含量 (70.3%) を示す点、ならびに低酸素条件で増殖する点で、上述した未知門に含まれる可能性が高い。一方で、本菌のゲノム解読がなされていないことから、その呼吸酵素遺伝子に関する情報が得られていない。そこで、本菌の全ゲノム情報を解読することを目的として、その培養を行った。

文献に記載のとおり、グルコースを炭素源とし低濃度 (0.1%) の酵母エキスを添加した無機塩培地を嫌気的な条件で作成し培養に用いたが、全く同じように作成した培地でも増殖が起こる場合と起こらない場合があり、細胞の回収を効率的に行うことができなかった。最終的に増殖が起こった培養液から回収した細胞を集めて染色体 DNA を回収したが、PacBio システムを用いたゲノム完全解読に必要とされるクオリティーの DNA ライブラリーを作成するに至らず、現在までに解読は完了していない。増殖が起こらないこと理由は今のところ不明のままであるが、それが明確になることで、十分量の細胞を得ることはできると考えられるため、方針を変えることなく現在も同実験を進めている。

(2) *C. microaerophilus* の Cc0 活性

C. microaerophilus の培養は上述のように不安定であるが、一定の濁度にまで増殖した細胞について、TMPD (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylenediamine Dihydrochloride) を用いた Cc0 活性検定を行った。その結果、2 日間の培養によって回収された細胞に顕著な Cc0 活性が認められ、特に培養 24 h 後の細胞において高い活性値が観測された。また、これらの活性は反応液に 1 mM のアジ化ナトリウムを添加することで顕著に阻害された。これらの結果から、*C. microaerophilus* は予想通り Cc0 を有することが強く示唆された。

(3) 目的とする菌群の探索

Cc0 遺伝子を標的とする PCR による探索

本研究で予想する未知細菌門に含まれる菌群を取得するための探索を実施した。これまでの情報を元に、主に水圏試料を分離源として用い、栄養培地を用いた高温・微好気条件での培養を行い、以前に *Symbiobacterium* の指標として有効であったトリプトファナーゼ活性を定性的にチェックした。その結果、特に海洋試料から 60 で顕著な増殖を示す培養液が得られ、以前に実施した *Symbiobacterium* の探索でも認められたように、牡蠣の殻を分離源とした培養で顕著な増殖ならびにトリプトファナーゼ活性陽性の培養液が高い頻度で得られた。

次に、得られた培養液から細胞を回収、DNA を抽出し、Cc0 遺伝子を標的とするプライマーを用いた PCR により目的菌群の存在を調査する実験を行った。プライマーは、*Symbiobacterium* ならびに上述の菌群が保有する Cc0 サブユニットをコードする遺伝子に共通して存在する配列をもとにして設計した。その結果、ほとんどの培養液について増幅は認められないか、予想されるサイズと異なる大きさの断片の増幅が認められた。それらのいくつかについて塩基配列を決定したところ、目的の遺伝子ではないことが判明した。このように、PCR による目的とする遺伝子断片の増幅は現在までに認められておらず、プライマーの設計の方針を変更する必要があると考えている。

16S rRNA 遺伝子標的とする探索

で得られた培養液のうち、再現性良くトリプトファナーゼ活性を示した牡蠣殻に由来する培養を選抜し、DGGE 法を用いた菌相解析を行った。その結果いくつかの試料について、再現良く複数の菌からなると考えられる菌相を形成しているものが認められた。

そこで、これらのうち特に菌相が豊かであったトリプトファナーゼの活性が顕著であった B01, 02 および 06 から得られた総 DNA を鋳型にしてユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子の増幅断片集合体について、Nanopore 社の一分子シーケンサー GridION を用いた全長アンプリコン解析を実施した。その結果、2 つの牡蠣殻試料から得られた培養液において、*Firmicutes* ならびに *Clostridia* に位置しながらその下の既知の分類階層には含まれない配列が含まれていた。特に B02 試料において顕著なリード数が認められた（黄色）。今後、これらの配列をもとに、これらの培養試料から目的の菌群を選抜、分離、純化することを計画する。

(4) 展望

我々は、これまでに知られてこなかった細菌門の存在を探索によって挑戦的に切り開く計画として本課題に着手した。その成果によって、*Caldinitratiruptor* も予想する未知の分類群に含まれること 牡蠣殻試料から予想する菌群が得られる可能性が高いことが見いだされた。一方、当該門の存在に明確な確証はなく、現在得られている 5 属の存在に基づいた予測にすぎないこと、また、当該菌群がこれまで殆ど得られてこなかったことから、存在が見込まれるもののその分離培養が極めて困難である可能性もある。しかし、予想される菌群は、地球生命の歴史において重要なイベントである好気呼吸の進化に関するミッシングリンクを解き明かす鍵になる分類群であると考えられることから、そのインパクトは極めて大きい。さらに、本菌群の分離のための技術的な基礎が確立すれば、これまでに分離培養がされてこなかった微生物群集にアクセスする手段となり、従来手法では扱うことができない菌群を対象を広げた基礎微生物学の新たな展開と、それを利用したバイオテクノロジーの発展にも大きく寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|