

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15153

研究課題名（和文）DPANN群に属する共生アーキア培養株の確立と共生機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of DPANN-host Cocultures and Elucidation of Their Symbiotic Mechanism

研究代表者

酒井 博之（Sakai, Hiroyuki）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90845009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：DPANN群は生理・生態・進化の観点から微生物生態学分野において最も注目されている系統群の一つであるが、培養株が限られており、生理生態はほとんど未知である。本研究では、DPANN群の生理生態を解明していくための研究基盤を構築する事を目的として、(i) DPANNアーキア培養株を確立し、(ii) 培養性状を詳細に明らかにし、(iii) 共生機構の解明を目指して研究を行った。その結果、9株のDPANNアーキアを培養することに成功し、そのうち1株（YN1株）について、詳細な培養性状・細胞形態・ゲノム性状を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPANN群は2013年に提唱されたアーキア多様性の約半分を占める巨大系統群であるが、これまで培養報告が10件しかなく生理生態はほとんど未知である。培養に依存しない手法を用いた多くの研究により、生理・生態・進化的な側面から様々な議論がなされているが、それらの多くは推測の域を出ないため、培養株を用いた実験的検証が望まれている。本研究は、わずか3年という研究期間で、9株もの新規DPANNアーキア培養株を確立した。本研究の学術的・社会的意義は、多くの培養株を確立したことで、今後、実験室内での検証が可能となり、最終的にはDPANN群の未知の生理生態を解明することへとつながる点にある。

研究成果の概要（英文）：The DPANN superphylum is one of the most notable lineages in the field of microbial ecology from physiological, ecological, and evolutionary perspectives. However, due to the limited availability of cultured strains, their ecophysiology remains largely unknown. This project aimed to establish a research foundation for elucidating the physiological ecology of the DPANN by (i) establishing new DPANN-host coculture systems, (ii) characterizing their physiological features, and (iii) unraveling their symbiotic mechanisms. As a result, we have successfully established nine DPANN-host cocultures, and for one of these DPANN strains, namely YN1, we were able to determine detailed physiological characteristics, cell morphology, and genomic traits.

研究分野：微生物生態学

キーワード：DPANN Nanobdellati 共生微生物 アーキア 好熱好酸性菌 極限環境微生物 微生物間相互作用 Sulfolobales

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DPANN 群は、地球上のアーキア多様性の約半分を占める生物群である。細胞およびゲノムが極めて小さく、中央代謝に関わる多くの遺伝子を持たないため、他種微生物(宿主)の代謝に依存して増殖する「絶対共生性アーキア」だと考えられている。実際に、申請者が培養に成功した新奇 DPANN アーキアは、宿主との共培養下でのみ増殖する。DPANN アーキアは、その共生機構により、自然環境中で様々な宿主の活動・代謝・進化に影響を与えているに違いない。もしそうであれば、その共生機構の解明は、原核生物の生理・生態・進化、ひいては(原核生物の関わる)物質循環に関する考え方を、大きく変える可能性を秘めている。しかし、(i) 培養例が極めて少ないため、DPANN アーキアの生理生態はほとんど未知である。また、(ii) 数件の培養報告がある一方で、世界のどの菌株保存機関にも培養株は寄託されていない(=研究材料として誰もが利用できる状態にない)。その為、実質的には培養株は確立されておらず、この先の研究を進めることは困難な状況にある。(i)・(ii) の最大の原因は、DPANN アーキアを宿主と共に培養維持する事が極めて難しい点にある。申請者は最近、酸性温泉から新奇 DPANN アーキアを培養する事に成功し、安定して培養維持する為の具体的な実験手順を確立した。更に、この新奇 DPANN アーキアは「3属5種の既知アーキアと共培養できること」を世界で初めて実験的に確認した。この事から申請者は「既知アーキアの培養液」に、「フィルターろ過した酸性温泉試料(DPANN細胞)」を混ぜて培養すれば、DPANN アーキアを狙って培養することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、DPANN アーキアの生理生態を解明していくための研究基盤を構築する事を目的として、(i) DPANN アーキア培養株を可能な限り確立し、(ii) 確立した培養株について培養性状を詳細に明らかにし、(iii) 培養株が有する共生機構の解明を目指して研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 酸性温泉試料の原核生物群集構造解析

国内6カ所の酸性温泉(神奈川県仙石原温泉、鹿児島県霧島温泉、大分県塚原温泉、大分県恵下温泉、大分県血の池地獄、大分県明礬温泉)において温泉試料を採取し、市販のDNA抽出キットを用いて環境DNAを抽出した。その後、メタゲノムDNA解析法または16S rRNAアンプリコン解析法を用いて各温泉試料中の原核生物群集構造を明らかにした。

(2) 実験計画の変更

研究開始当初、「既知アーキアの培養液」に「フィルターろ過した酸性温泉試料(DPANN細胞)」を混ぜて培養すれば、DPANN アーキアを狙って培養することができると考えていたが、本手順を用いて予備実験を実施した結果、大きな問題点として、フィルターろ過後の温泉試料中にはDPANN アーキア以外の種も多く抜けてしまうことが明らかとなった(例:細胞壁を持たない *Thermoplasmatales* 目アーキアなど)。一方で、一般的な集積培養法でもDPANN アーキアが培養できることが示唆される結果が得られていたため、労力を要する上述の培養手法は使用しないこととした。代わりに、集積培養法を用いてDPANN アーキアおよび宿主の集積培養系を確立することとした。また、新型コロナウイルスの影響により、初年度に予定していた複数地域からの温泉試料採取ができなかったため、研究室において凍結保存されていた未解析の集積培養液を解析対象として加えた。

(3) 凍結保存されていた集積培養液の原核生物群集構造解析

上述の通り、初年度に予定していた複数地域からの温泉試料採取ができなかったため、研究室において凍結保存されていた未解析の集積培養液を解析対象として加え、16S rRNA アンプリコン解析法による原核生物群集構造解析を実施した。

(4) DPANN・宿主集積培養系の確立・保存

鹿児島県霧島温泉（2022 年度）および大分県塚原温泉（2023 年度）において採取した温泉水を植種源として、培地に添加する炭素源、電子供与体、培養温度、培地 pH の異なる多様な条件を用いて集積培養を行った。集積培養後、微生物の増殖が確認された全ての培養系列について、最終濃度 10%となるようにグリセロールを添加して凍結保存 (-80°C) した。一方、1~2 mL の集積培養液を遠心分離して得られた細胞ペレットを原核生物群集構造解析に使用した。

(5) 集積培養系の原核生物群集構造解析

各集積培養液由来の細胞ペレットから、市販の DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出後、16S rRNA アンプリコン解析法を用いて各集積培養系の原核生物群集構造を明らかにした。

(6) DPANN・宿主純粋共培養系の確立

DPANN アーキアが検出された集積培養系から、限界希釈法を用いて共培養系の純化を試みた。凍結保存していた集積培養液を復元培養後、培養液の希釈系列（例： 10^4 ~ 10^9 希釈）を作製して最大 4 週間培養した。その際、各希釈系列につき 20~200 程度の本数を用意した。培養容器としてガラス試験管（16.5 φ）または 96 ウェル PCR プレートを使用した。増殖が確認された系列のうち、希釈率の最も高かった上位 2 系列の培養液について、DPANN および宿主にそれぞれ特異的なプライマーを用いて定量 PCR を行った。できるだけ希釈率が高く、かつ DPANN アーキアの割合の高かった系列を選択して同様の手順を繰り返した。本手順を少なくとも 3 回実施後に得られた培養系を純粋共培養系とみなしてショットガンゲノムシーケンスに供した。

(7) DPANN・宿主純粋共培養系のショットガンゲノムシーケンス

共培養液を遠心分離して得られた細胞ペレットから、市販のキットを用いて DNA 抽出後、ショットガンゲノムシーケンシングを行った。ショートリード取得のために NovaSeq シークエンサー(150 bp×2) または DNBSeg シークエンサー(200 bp×2)を、ロングリード取得のために MinION シークエンサーを使用した。

(8) ゲノム解析

ショットガンゲノムシーケンスで取得したショートリードおよびロングリードを Unicycler、Metawrap、Nanophase 等のプログラムを用いてアセンブリした。その後、解析対象を 1 株 (YN1 株) にしぼり、詳細なゲノム解析を実施した。具体的には、Prokka、DFAST 等のプログラムを用いて遺伝子情報を付与し（アノテーション）、KEGG 等のプログラムを用いてゲノム情報に基づく代謝経路の推測を行った。GTDB データベースからダウンロードした近縁種のゲノム配列情報と共に、アーキアの 53 個のマーカータンパク質のアミノ酸配列情報に基づいて最尤系統樹を作成した。

(9) 新規 DPANN アーキア YN1 株の生理性状解析

YN1 株について詳細な生理性状解析を実施した。具体的には、増殖曲線の作成、生育温度・pH 範囲の決定、宿主範囲の調査を行った。手法は Sakai らの方法 (Sakai et al. *PNAS*. 2022) に従った。

(10) 形態観察（光学および電子顕微鏡観察）

YN1 株について、光学顕微鏡（位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡）、走査型電子顕微鏡、透過型顕微鏡を用いて、DPANN アーキアおよび宿主の詳細な形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) 温泉試料の原核生物群集構造

メタゲノム DNA 解析法または 16S rRNA アンプリコン解析法を用いて複数の酸性温泉試料について原核生物群集構造を明らかにした結果、全ての酸性温泉試料から DPANN アーキアの遺伝子配列が検出された。特に、大分県塚原温泉において採取した酸性温泉試料中からは DPANN アーキアが全体の 5 割以上を占める高い割合で検出された。そのため、最終年度において塚原温泉で再度試料採取を行い、本試料を植種源として用いて更なる新規 DPANN アーキア培養株の確立を試みた。

(2) 凍結保存されていた集積培養液の原核生物群集構造解析

研究室において凍結保存されていた未解析の 2 つの集積培養液について、原核生物群集構造を明らかにした。その結果、どちらの集積培養液からも DPANN アーキアの遺伝子配列が検出された。

(3) 集積培養系の原核生物群集構造解析

鹿児島県霧島温泉（2022 年度）および大分県塚原温泉（2023 年度）において採取した温泉試料を植種源として用いた他系列の集積培養系について原核生物群集構造解析を行った結果、いくつかの系列から DPANN アーキアの遺伝子配列が検出された（図 1）。比較的 DPANN アーキアの割合が多かった集積培養系を選択し、限界希釈法を用いて DPANN・宿主純粋共培養系の確立を試みた。

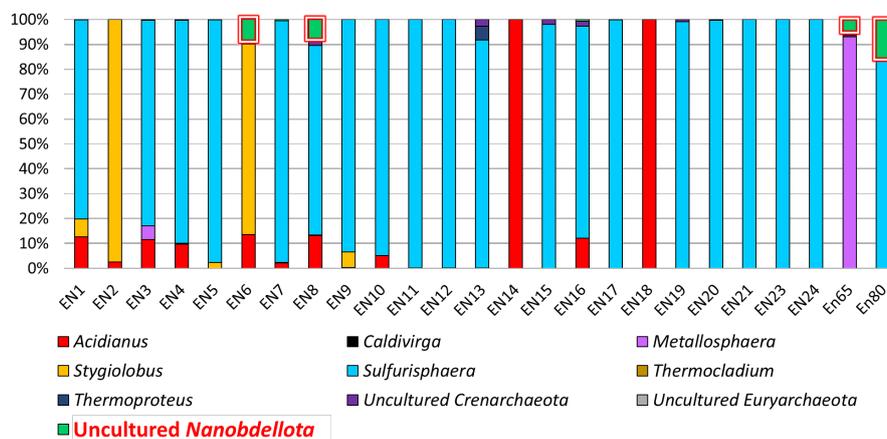


図 1. 集積培養系列の原核生物群集構造. ※全系列のうち 25 系列分のみを含めたデータセットで作成したグラフ. 図中の Uncultured Nanobdellota が DPANN アーキア.

(4) DPANN・宿主純粋共培養系の確立

限界希釈法を用いた DPANN・宿主純粋共培養系の確立を試みた結果、最終的に 9 つの DPANN・宿主純粋共培養系を確立することに成功した。DPANN アーキアをそれぞれ YN1 株、YN4 株、KR1 株、KR2 株、TK5 株、TK6 株、TK7 株、TK8 株、TK10 株と名付け、宿主をそれぞれ YN1HA 株、YN4HA 株、KR1HA 株、KR2HA 株、TK5HA 株、TK6HA 株、TK7HA 株、TK8HA 株、TK10HA 株と名付けた。

(5) ショットガンゲノムシーケンスおよびゲノム解析

ショットガンゲノムシーケンスおよびゲノム解析の結果、確立した全ての株について、高品質なドラフトゲノム配列または全ゲノム配列を決定した。9株のDPANNアーキアのゲノムサイズは約0.7~0.8 Mbpであり、宿主アーキアのゲノムサイズは約2~3 Mbpであった。

(6) 新規DPANNアーキア YN1 株のゲノム解析

YN1 株について詳細なゲノム解析を実施した結果、YN1 株は中央炭素代謝に関わる多くの遺伝子を持たない一方で、遺伝情報処理に関連する多くの遺伝子を有することが明らかとなった(図2)。YN1 株はビタミン、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質などの材料を宿主から受け取らなければ増殖できない絶対共生性のアーキアであることが示唆された。また53個のマーカータンパク質のアミノ酸配列に基づく最尤系統樹を作成した結果、YN1 株は *Nanobdellota* 門に属することが示された。

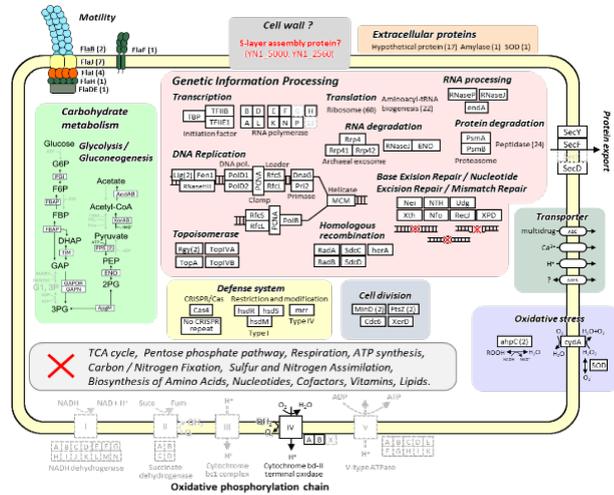


図2. ゲノム情報から推測された YN1 株の代謝経路。

(7) 新規DPANNアーキア YN1 株の生理性状解析

YN1 株の生育温度範囲は 55-95°C (至適 80°C)、生育 pH 範囲は 2.0-3.0 (至適 3.0) であった。また、YN1 株は単離した宿主 *Sulfurisphaera ohwakuensis* YN1HA に再感染可能であった。加えて、別の地域から分離された *S. ohwakuensis* TA1^T 株にも再感染可能であった。

(8) 形態観察 (光学および電子顕微鏡観察)

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いた蛍光顕微鏡観察、および電子顕微鏡観察の結果、YN1 株は直径約 300~500 nm の極小細胞を持ち、宿主 YN1HA 株に付着して増殖することが明らかとなった(図3)。

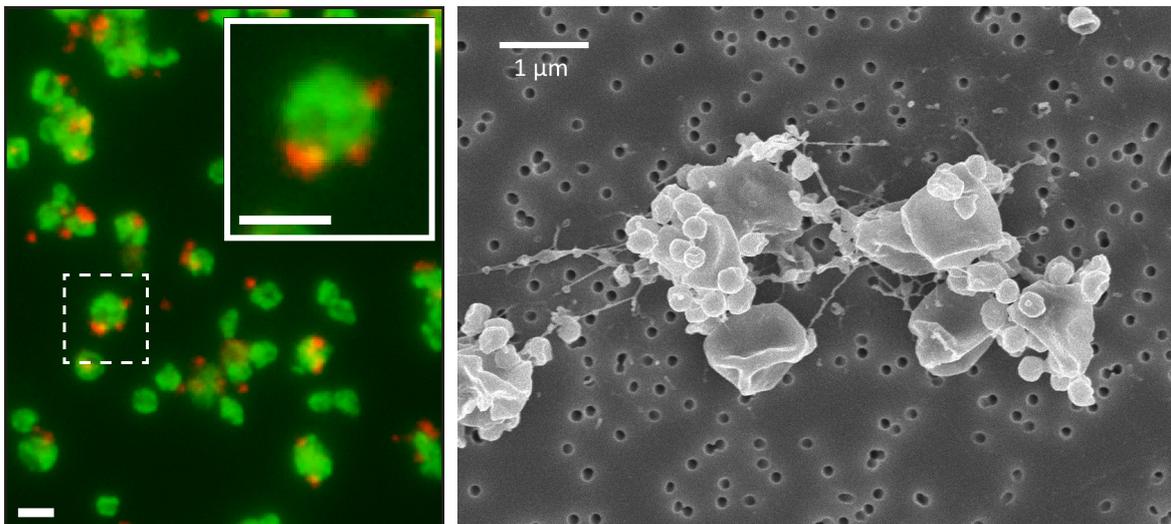


図3. YN1 株の形態観察. 左: FISH 法を用いた蛍光顕微鏡観察 (赤: YN1 株、緑: 宿主)、右: 走査型電子顕微鏡観察 (直径 500 nm 未満の小さな細胞が YN1 株、直径約 1 μm の細胞が宿主 YN1HA 株).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai Hiroyuki D., Nakamura Koichi, Kurosawa Norio	4. 巻 72
2. 論文標題 Stygiolobus caldivivus sp. nov., a facultatively anaerobic hyperthermophilic archaeon isolated from the Unzen hot spring in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005486	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 Sakai Hiroyuki D., Nur Naswandi, Kato Shingo, Yuki Masahiro, Shimizu Michiru, Itoh Takashi, Ohkuma Moriya, Suwanto Antonius, Kurosawa Norio	4. 巻 119
2. 論文標題 Insight into the symbiotic lifestyle of DPANN archaea revealed by cultivation and genome analyses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2115449119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2115449119	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 該当する
1. 著者名 Johnson Matthew D, Sakai Hiroyuki, Paul Bindusmita, Nunorura Takuro, Dalvi Somavally, Mudaliyar Manasi, Shepherd Doulin, Shimizu Michiru, Udupa Shubha, Ohkuma Moriya, Kurosawa Norio, Ghosal Debnath	4. 巻 NA
2. 論文標題 A large attachment organelle mediates interaction between a novel Nanobdellota archaeon YN1 and its host	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.05.04.592509	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 該当する
1. 著者名 Johnson Matthew D, Shepherd Doulin C, Sakai Hiroyuki D., Mudaliyar Manasi, Pandurangan Arun Prasad, Short Francesca L, Veith Paul D., Scott Nichollas E, Kurosawa Norio, Ghosal Debnath	4. 巻 NA
2. 論文標題 Novel cell-to-cell interactions revealed by cryotomography of a DPANN coculture system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.05.20.594898	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 酒井博之、面川博美、中村光一、布浦拓郎、黒沢則夫
2. 発表標題 A Simple and Easy Way to Isolate Nanoarchaea from Acidic Hot Springs
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井博之、黒沢則夫
2. 発表標題 別府温泉からの培養可能な新規ナノアーキアの探索
3. 学会等名 日本微生物資源学会第29回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井博之、面川博美、中村光一、高見清正、布浦拓郎、黒沢則夫
2. 発表標題 好熱好酸性ナノアーキアの分離培養
3. 学会等名 日本Archaea研究会第35回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川聡、島村繁、高松芳基、酒井博之、加藤真悟、澤山茂樹、矢木宏和、矢木真穂、谷中冴子、加藤晃一、高井研
2. 発表標題 DPANNおよび宿主アーキアの経時的グライコプロテオミクス
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井博之、面川博美、中村光一、高見清正、中川聡、布浦拓郎、大熊盛也、黒沢則夫
2. 発表標題 酸性温泉からの新規DPANNアーキア培養株の確立
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井博之、布浦拓郎、黒沢則夫
2. 発表標題 好気条件下で増殖する新規ナノアーキアの分離
3. 学会等名 第23回極限環境生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川聡、島村繁、酒井博之、加藤真悟、高松芳基、澤山茂樹、矢木宏和、矢木真穂、谷中冴子、加藤晃一、高井研
2. 発表標題 DPANNアーキアおよびその宿主・非宿主のグライコプロテオミクス
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井博之、Naswandi Nur, Antonius Suwanto, 加藤真悟、雪真弘、清水美智留、伊藤隆、大熊盛也、黒沢則夫
2. 発表標題 Micrarchaeota門に属する新奇DPANN アーキアARM-1 株の生理生態
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Sakai
2. 発表標題 Insight into the symbiotic lifestyle of DPANN archaea revealed by cultivation and genome analyses
3. 学会等名 Insight into Thermophiles: Cultivation and Genome Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井博之, 中村光一, 黒沢則夫
2. 発表標題 新規好熱好酸性アーキアStygiolobus sp. KN-1株の多相分類学的解析 Stygiolobus属は偏性嫌気性ではない
3. 学会等名 酒井博之, 中村光一, 黒沢則夫
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井博之, 面川博美, 加藤真悟, 伊藤隆, 大熊盛也, 黒沢則夫
2. 発表標題 Sulfolobales目に属する新規好熱好酸アーキアHS-7株の多相分類学的解析
3. 学会等名 日本微生物資源学会第28回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Laboratory cultivation provided insight into the symbiotic lifestyle of DPANN archaea
2. 発表標題 Sakai HD, Nur N, Kato S, Yuki M, Shimizu M, Itoh T, Ohkuma M, Suwanto A, Kurosawa N
3. 学会等名 12th Asian Symposium on Microbial Ecology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井博之、布浦拓郎、黒沢則夫
2. 発表標題 DPANN群に属する新規超好熱好酸性ナノアーキアYN1株の増殖特性およびゲノム解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井博之、加藤真悟、伊藤隆、大熊盛也、黒沢則夫
2. 発表標題 集積培養による塩原温泉アーキア群集構造の変化
3. 学会等名 日本Archaea研究会第33回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 黒沢則夫、酒井博之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 504
3. 書名 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線 監修(伊藤政博、鳴海 一成、道久則之) [分担執筆] 第2編 第1章 第6節 難培養共生性好熱菌および好冷菌の探索と培養 pp. 261-276.	

1. 著者名 酒井博之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 578
3. 書名 微生物資源の整備と利活用の戦略 監修(大熊盛也) [分担執筆] 第5章 第1節 アーキア未培養系統の分離培養 pp.379-392.	

1. 著者名 黒沢則夫、酒井博之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 504
3. 書名 [分担執筆] 第2編 第1章 第6節 難培養共生性好熱菌および好冷菌の探索と培養. 監修(伊藤政博、鳴海一成、道久則之).	

1. 著者名 酒井博之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 578
3. 書名 [分担執筆] 第5章 第1節 アーキア未培養系統の分離培養. 微生物資源の整備と利活用の戦略. 監修(大熊盛也). 編集委員(石田達也、乙黒美彩、飯田敏也、大熊盛也)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>DPANN群に属する難培養性アーキアの培養に成功 https://www.soka.ac.jp/news/2022/01/6800/ DPANN群に属する難培養性アーキアの培養に成功 - 寄生性アーキアの新しい生理生態を発見 - https://www.riken.jp/press/2022/20220117_2/index.html</p>
--

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
---------	---------

オーストラリア	メルボルン大学			
インドネシア	IPB University	Muhammadiyah University of Jakarta		