

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570117

研究課題名(和文) 高度に新規な「ゆっくり増える菌」の系統分類および生物地理に関する研究

研究課題名(英文) Phylo-geographic study on highly novel slow-growing microorganisms

研究代表者

長沼 毅 (NAGANUMA, Takeshi)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70263738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：チュニジアから単離した菌株(Shr3株)は、既知のどの菌とも16S rRNA遺伝子の相同性が最大82%しかない好気性の細菌である。これに近縁な環境細菌2種と合わせた3株について、生理生化学的特性を明らかにし、その系統進化と生物地理に関する知見を得るために、様々な実験や分析を行い、データ収集・解析を行った。その結果、Shr3がProteobacteria門に帰属する既知の菌群とは系統的に異なる非常に高いレベルの新規分類群であることを確認し、Shr3株を英国微生物菌株保存機関 NCIMB に寄託した。環境細菌2種についても、新規分類群であることを確認し、Shr3と併せて学術論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：A slow-growing aerobic bacterium, named Shr3, was isolated from an arid area in Tunisia, and was only distantly related to all other known organisms at <82% similarity of 16S rRNA gene sequences. Along with other genetic, biochemical and physiological properties, the isolate Shr3 was shown to be a highly novel new species, representing a new Class within the Phylum Proteobacteria. This taxonomic proposal has been subject to expert reviews. A copy (sub-culture) of the Shr3 strain has been deposited at National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB), UK. In addition to Shr3, two more isolates were also characterized to propose new taxa, i.e., species, genera, families, orders, or higher.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：分類群 微生物 ゆっくり増える菌 生物地理 チュニジア サハラ砂漠

### 1. 研究開始当初の背景

サハラ砂漠東縁(チュニジア)から単離した微生物株の中に、通常の微生物に比べ非常に「ゆっくり増える」好気性の菌が1株(Shr3と命名)見つかった。その株は、一般的に知られる微生物の増殖速度からは大きく外れた、非常に「ゆっくり増える菌」であり、しかもその16S rRNA 遺伝子は、既知のどの菌とも相同性が最大で82%しかないという、とても尋常とは言えない菌であった。

2003年に日本の花田・鎌形らが新門を提唱して話題になった好気性菌と既知菌との相同性は最大85%であったので、この菌は、それと同程度に高いレベルで新規分類群を提唱できる可能性があった。

また、この菌に相同性98%と近縁な環境DNA シーケンスが日本の研究者によって水田の脱窒層(嫌気層)から検出されており、この環境細菌2株もまた、高度新規菌の可能性が高い菌であることが予想された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、既知のどの菌とも16S rRNA 遺伝子の相同性が最大で82%しかない、チュニジアから単離した好気性の菌株(Shr3)と、これに近縁(相同性98%)な、水田の脱窒層から検出された環境細菌2種とを合わせた3株について、生理生化学的特性を明らかにして記載するとともに、その系統進化と生物地理に関する知見を得ることとした。

### 3. 研究の方法

(1) <一般的な記載項目セットのデータ取得>

本研究では、まず、Shr3株の同定分類が行えるだけのShr3株の培養を行わなければならない。そもそも、Shr3は、非常に「ゆっくり増える菌」であり、培養に大変時間がかかる。培地は、R2A培地という比較的簡単な培地だが、生育が非常に遅く、菌を植え継いでから4~5日でようやくコロニーが出てくるといった具合で、通常の菌の増殖からは考えられないほど遅い。(例えば大腸菌なら、一日もあれば多数のコロニーが見られる。)

最適な培養温度を探りながら、実験に使用できるだけの十分な菌株の培養を行った。

その上で、Shr3株の同定分類について伝統的な方法で行った。具体的には既得の16S rRNA 遺伝子シーケンス(AB540021)以外の一般的な記載項目、たとえば、細胞形態や化学分類・数値分類に関するデータならびにDNAのGC含量などのデータを取得した。

(2) <バイオインフォマティクスによる系

統分類的な位置づけ>

Shr3株の16S rRNA 遺伝子(AB540021)について予察的な分子系統樹を描くと、プロテオバクテリア門という巨大グループのサブグループ、つまり、綱(class)から亜門(sub-phylum)のレベルの新規分類群に位置することが予想された。そこで、Shr3を含む高度新規菌3株について16S rRNA 遺伝子および他の遺伝子のシーケンスについて、バイオインフォマティクスによる詳細な検討を行った。

(3) <16S rRNA 遺伝子のPCRプライマーを用いた系統地理的な分布調査>

Shr3株の16S rRNA 遺伝子に特異的なPCRプライマーを作成し、私たちがこれまでに集めた世界各地の環境サンプルに対し網羅的なPCR検出を行った。予察的にPCRプライマーを作成し南極サンプルに試したが、検出できなかった。また、国内の多様な環境(陸)からも——火山や深部地下からも——サンプルを採集しPCR検出を試みただけでなく、広島大学の「豊潮丸」を用いて海洋試料の採集も行いPCR検出を試みた。

### 4. 研究成果

(1) <一般的な記載項目セットのデータ取得>

まず、既知のどの菌とも16S rRNA 遺伝子の相同性が最大で82%しかない、チュニジアから単離した好気性の菌株(Shr3)の同定分類を行うに先だって、この菌の培養を行った。この菌は、非常に「ゆっくり増える菌」であり、培養に大変時間がかかる。R2A培地で培養を繰り返しながら、最適な培養温度を探り、25℃の温度条件下で、翌増殖することがわかった。最適な培養温度である25℃の条件下において、じっくりと時間を掛け培養・菌の植え継ぎを根気強く続け、菌の同定分類を行うことが出来る株数にまで増殖を行った。

実験に使えるだけ十分な菌株を得たところで、細胞形態や化学分類・数値分類といった一般的な記載項目に関するデータ、性状試験(炭素源資化性)、および、DNAのGC含量などのデータを取得した。細胞内微細構造の詳細観察を行うため、透過電子顕微鏡(TEM: JEM-1200EX, 日本電子, 東京)で超薄切片法も行った。

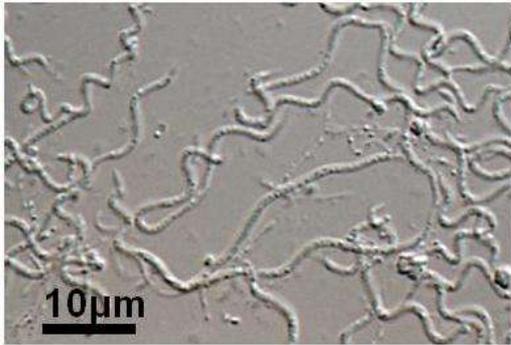


図 1. Shr3 の光学顕微鏡写真。

細胞は、糸状や細長い紡錘状、螺旋状をしている。Shr3 は、R2A 培地で 5 日間、25°C で培養されたもの。微分干渉顕微鏡によって観察されたもので、バーの長さは 10 μm を示す。

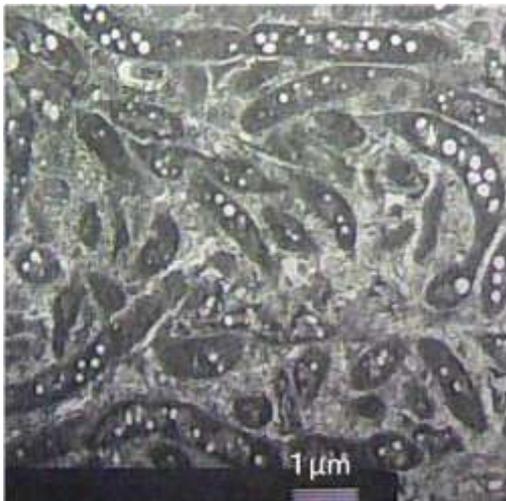


図 2 Shr3 細胞の透過電子顕微鏡細胞組織画像。電子密度の低い部分がたくさん見られる。Shr3 は、R2A 培地で 7 日間、25°C で培養されたもの。バーの長さは 1 μm を示す。

(2) <バイオインフォマティクスによる系統分類的な位置づけ>

次に、Shr3 を含む高度新規菌 3 株 (Shr3 に近縁で、Shr3 との相同性が 98% である、水田の脱窒層から検出された環境細菌 2 種と合わせた 3 株) について、16S rRNA 遺伝子、および、他の遺伝子のシーケンスに関するバイオインフォマティクスによる詳細な検討を行った。また、それらをもとに作成した最尤法・近隣結合法・最節約法の 3 種の系統解析法による分子系統樹を作成した。相同性検索には、アポロン DB-BA6.0 のデータベース (2010 年 3 月現在、約 7,700 種)、および、GenBank/DDBJ/EMBL を用いた。

(3) <16S rRNA 遺伝子の PCR プライマーを用いた系統地理的な分布調査>

さらに、Shr3 株の 16S rRNA 遺伝子に特異的な PCR プライマーを作成し、これまでに集めた世界各地、南極、北極、砂漠などの環境サンプルに対し、網羅的な PCR 検出を行った。また、国内の火山、深部地下、海洋といった多様な環境からもサンプルを採集し、PCR 検出を試みた。しかし、全く検出することができなかった。

上記の様々な実験や分析等から得られたデータ、および、データ解析の高度な信頼性の確保のために、当研究機関を通じて、国立遺伝学研究所の DNA データベース (DDBJ) を利用し、さらに、英国微生物菌株保存機関 NCIMB のグループ企業 (株式会社テクノスルガ・ラボ) の専門家らとも、ディスカッションを重ねてきた。その結果、取得したデータの信頼性は極めて高く、Shr3 は *Proteobacteria* 門に帰属する既知の菌群とは系統的に異なる、新規な細菌であり、分類群上非常に高い綱レベルで新しい分類群を構成する細菌であることが示された。

そして最尤法・近隣結合法・最節約法の 3 種類の方法によって作成された系統解析法による分子系統樹全てにおいても、系統学的に高度に新規である (系統樹内で、既報の未だ培養されていない塩基配列のみでクラスターを作る) ことが確認された。

この高度新規菌 Shr3 については、株英国微生物菌株保存機関 NCIMB に寄託し、寄託番号 NCIMB 14846 を得た。

Shr3 に近縁な、環境細菌 2 種についても、種・属・科・目、あるいはそれ以上の分類において新規菌である可能性が示された。これら新規菌の分離培養に関してはすでに学術論文として公表し、新規分類群の記載論文もすでに投稿済みである。

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)

(1) NAKAI Ryosuke, SHIBUYA Eri, JUSTEL Ana, RICO Eugenio, QUESADA Antonio, KOBAYASHI Fumihisa, IWASAKA Yasunobu, SHI Guang-Yu, AMANO Yuki, IWATSUKI Teruki, NAGANUMA Takeshi, Phylogeographic analysis of filterable bacteria with special reference to Rhizobiales strains that occur at cryospheric habitats, *Antarctic Science*, 25, 査読有, 2013, pp. 219-228

(2) JADOON Waqar Azeem, NAKAI Ryosuke, NAGANUMA Takeshi, Biogeographical note on Antarctic microflorae: endemism and cosmopolitanism, *Geoscience Frontiers*, 4, 査読有, 2013, pp633-646 (2012, online)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長沼 毅 (NAGANUMA, Takeshi)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：

7 0 2 6 3 7 3 8