

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：82626
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657069
 研究課題名（和文）超高速シークエンサーで切り拓く陸域地下生物圏の多様性とレアバイオスフィア
 研究課題名（英文）Microbial diversity and rare-biosphere in terrestrial subsurface environments revealed by high-throughput sequencing technologies
 研究代表者
 玉木 秀幸（HIDEYUKI TAMAKI）
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
 研究者番号：00421842

研究成果の概要（和文）：

本研究では、超高速シークエンサーを活用し、陸域地下圏の微生物生態系の多様性をこれまでにない解像度で解明した。実際に、従来法よりも100-400倍高い解像度で陸域地下圏微生物生態系を捉えることに成功し、解析した陸域地下圏環境には、機能的にも系統的にも非常に多様な微生物群の存在が示された。特に、本研究により、陸域地下圏のレアバイオスフィアは非常に高い多様性を有し、未知の細菌系統群が存在することが明らかとなり、レアバイオスフィアが同環境の微生物生態系の頑健性を支える重要な生物圏であることが示される等、陸域地下圏に棲息する微生物群の真の多様性と未知機能の解明に資する重要な基盤的知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed the hidden microbial diversity and rare-biosphere in unexplored terrestrial subsurface environments by using massively parallel 16S rRNA sequencing via high-throughput sequencing technology. Indeed, the state of the arts method provided microbial diversity and community information at 100-400 times higher resolution than the conventional method. The further analyses showed that the microbial communities were phylogenetically and physiologically diverse and could be actively involved in biogeochemical processes. Furthermore, the rare-biosphere in the terrestrial subsurface showed unexpectedly high diversity, harbored the novel microbial lineages such as candidate phyla that had not been detected, and likely supported robustness in the microbial ecosystems. Thus, the findings shed light into largely unknown microbial community, diversity, and ecological functions in the terrestrial subsurface ecosystems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：群集・生態系多様性、未知微生物系統群、陸域地下圏

1. 研究開始当初の背景

地球上には膨大かつ多様な微生物（原核生物）が存在しているが、その多く（99%）は未だ培養されたことのない、いわゆる未知・未培養微生物であると言われてしている。この地球最大の未知生物圏を構成する微生物の種類、多様性を明らかにすることは、その多様な未知機能を解明するための第一歩であり、重要な基盤的研究課題であるにもかかわらず、原核生物の地球環境中における”真”の多様性を明らかにすることは技術的に極めて難しい。原核生物の多様性解析技術として最も汎用されているのは分子系統マーカー遺伝子である 16S rRNA 遺伝子を対象としたクローン解析である。この技術は培養することなく環境中に存在する未知微生物群の多様性を明らかにする有効な手法であるものの、その解析にかかる時間、手間、コストに限界があり、通常、対象環境中に 1%以上の割合で存在する微生物のみを解析対象としている。微生物生態系において 1%というのは氷山の一角でしかなく、従来法では非優占種として重要視されていなかった、あるいは個体群が低すぎて検出することすら困難であった希少構成種も実環境中で大きな役割を担っている可能性がある。さらに、マイナーな微生物群が、様々な環境変動等に応じて優占種になる可能性を考えると、実環境中において稀少構成種から成るレアバイオスフィアを含めた”真”の微生物多様性を解明することは、複合微生物生態系を取り扱うあらゆる学術・産業分野において最も基盤的でありながらも非常に重要な研究課題である。

2. 研究の目的

本提案では、次世代シーケンサーを活用し、特に、陸域地下圏環境に棲息する未知微生物群の多様性をこれまでになく解像度で明らかにすることを目的とした。近年、陸域地下圏環境には膨大な数の微生物の存在が明らかにされており、その数は地球上の全微

生物の 90%以上をも占めると言われており、地下微生物が地球規模の重要な物質循環プロセスに大きく関与している可能性を示唆されている。しかしながら、他の土壌圏、海洋圏等に比べ、地下微生物群の分子生態学的研究は非常に乏しく、その機能はおろか、地下圏に存在する微生物群の種類、多様性に関する情報も極めて限られている。本提案は、複数の陸域地下圏環境において超高解像度微生物多様性解析を実施することで、レアバイオスフィアを含めた”真”の地下微生物の多様性を明らかにするとともに、それぞれの環境特性の情報と微生物群集構造情報を統合的に解析し、メタン生成・消費活動、鉄や硫酸の還元反応といった重要な生物地球化学プロセスに果たす地下微生物群の未知機能解明に資するものである。

3. 研究の方法

本研究では、近年開発された 16S rRNA 遺伝子の超並列タグシーケンシング法を活用した。この手法は、DNA および RNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子を PCR もしくは RT-PCR 増幅するところまでは従来法と同様であるが、その後、クローニング作業等を経ることなく、直接超高速シーケンサー（ロシュ社製の 454 やイルミナ社製の HiSeq/MiSeq 等）により大量の配列を迅速に解読するというものである。さらに、PCR 用プライマーに各サンプルに応じたバーコード（タグ）配列を付与しておくことで、複数のサンプルを同時に多重配列解読することが可能である（タグ配列に応じて取得配列をサンプル毎に分けることができる）。これにより、多数の環境試料中の膨大な 16S rRNA 遺伝子を同時に多重解析することが初めて可能となり、迅速かつ簡便に、そしてこれまでになく高解像度で対象環境の微生物群の多様性、分布、個体群動態を半定量的に明らかにすることができる。

4. 研究成果

(1) 454 パイロシーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子の超並列タグシーケンス法の最適化

本研究では、まず、454 パイロシーケンサー (454 Titanium プラットフォーム) による 16S rRNA 遺伝子の超並列タグシーケンス法の最適化を行った。まず、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅に用いるユニバーサルプライマー (バクテリアドメイン、アーキアドメインを対象) の選定、改良を行った。16S rRNA 遺伝子データベースを基に、ARB ソフトウェアを用いて In silico でカバーレージの高いユニバーサルプライマーを複数選抜した。続いて、実際に、環境 DNA から 16S rRNA 遺伝子を増幅し、454 パイロシーケンシングを行ったところ、515F と 907R もしくは 909R のプライマーセットは非常に多様な原核生物系統群を網羅的に PCR 増幅でき、他のプライマーセットに比べてシーケンシングの結果も質、量の両面から非常に良好であったことから、454 Titanium プラットフォームに適したプライマーセットであると考えられた。次に、ロシュ社製から提供されているシーケンシングケミストリー 2 種 (LIB-A kit、LIB-L kit) とその改良版 1 種 (LIB-A-II) のあわせて 3 種のシーケンス方法について、実際に環境試料 (土壌や地下圏堆積物、地下水、飲料水パイプライン、嫌気性廃水処理プロセス等 10 種) 由来の 16S rRNA 遺伝子を解読することによって詳細に比較検討を行った。その結果、いずれの環境試料を用いた場合でも、16S rRNA 遺伝子解析用 kit である LIB-A ならびに LIB-A-II よりも、ゲノム解析用 kit である LIB-L を用いた方が、1.8~2.0 倍程度多くの配列数が得られることが明らかとなった。一方で、取得した 16S rRNA 遺伝子情報をもとに微生物群集構造と多様性指標 (Chao-1、H index、OTU 数等) を比較解析したところ、各手法間で大きな差は見られなかったことから、454 Titanium プラットフォームにより 16S rRNA 遺伝子を解読する場合には、LIB-L キットが適切であることが明らかとなった。本研究により、16S rRNA 遺伝子の

超並列タグシーケンスにおいて、シーケンシングケミストリーの重要性が示され、環境微生物学、微生物生態学分野の研究者はもとより、国内外の研究機関が有するシーケンスファシリティにも重要な基盤的知見を提示している。

また、今回解析した 10 種の環境中の微生物群集構造 (微生物種の組成) をもとに多次元尺度構成法 (MDS) による解析を実施したところ、環境の種類ごとに明瞭にグループ化されることが明らかとなった。特に、地下圏試料 (地下圏堆積物環境、地下水環境) は、他の表層土壌や水圏環境と異なり、特異的なグループを形成することが明らかとなった。このことは、陸域地下圏環境には他の環境にはみられないユニークな微生物群が存在していることを示唆している。

(2) 454 パイロシーケンサーによる陸域地下圏微生物群の高解像度多様性解析

先に最適化したパイロシーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子の超並列シーケンス法を用いて、陸域地下圏環境の微生物群の組成と多様性について解析を実施した。特に、氷河堆積物環境を対象として解析を実施した。氷河堆積物環境は、北半球において大きな面積を占める重要な陸域の地下圏であり、さらに有機物が豊富で微生物活性も高いことが予想されていることから、地球規模での物質循環を考える上でも重要な環境である。一方で、これまで氷河堆積物環境中の微生物群の多様性や群集構造についてはほとんど知見がないことから、今回の解析対象とした。

まず、地理的に異なる様々な陸域氷河堆積物環境試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を増幅し、パイロシーケンスに供試した。その結果、1 サンプルあたり 5000-17000 reads (平均長 400 bp) の 16S rRNA 遺伝子配列を取得した。その後、今回構築した解析パイプラインにより、微生物群集構造と多様性を解析した。まずバクテリアドメインについて解析したところ、氷河堆積物環境には、無酸素環境下において鉄還元

(*Deltaproteobacteria* 綱 *Desulfobacterales* 目細菌や *Firmicutes* 門 *Peptococcaceae* 科細菌等)、硫酸還元 (*Nitrospirae* 門 *Thermodesulfobivibrionaceae* 科細菌、 *Deltaproteobacteria* 綱 *Myxococcales* 目細菌、 *Desulfuromonadales* 目細菌等)、脱塩素 (*Chloroflexi* 門 *Dehalococcoidetes* 綱) 有機物分解 (*Chloroflexi* 門 *Anaerolineae* 綱細菌) に関与する可能性のある微生物群とともに、微好気条件下で鉄酸化 (*Betaproteobacteria* 綱 *Galionellales* 目細菌、 *Gammaproteobacteria* 綱 *Methylococcales* 目細菌)、メタン酸化 (*Alphaproteobacteria* 綱 *Methylocystaceae* 科細菌)、C1化合物資化 (*Betaproteobacteria* 綱 *Methylophilales* 目細菌、 *Rhodocyclales* 目細菌、 *Gammaproteobacteria* 綱 *Methylococcales* 目細菌) に関与する微生物群が優占しており、系統学的にも機能的にも多様な微生物群の存在が示唆された。次に、アーキアドメインについて詳細に解析したところ、氷河堆積物環境には *Euryarchaeota* 門アーキアが優占しており、特に系統学的に多様なメタン生成アーキア (*Methanobacteriales* 目、 *Methanococcales* 目、 *Methanocellales* 目、 *Methanomicrobiales* 目、 *Methanosarcinales* 目アーキア) やごく最近になってメタン生成に関与することが明らかになった *Thermoplasmata* 綱の E2 terrestrial group が比較的多く存在することが明らかとなった。一方で、検出されたこれらの微生物群のポピュレーションは、サンプルごとに大きく異なっていることが示された。そこで、取得した微生物群集構造情報をもとに多次元尺度構成法 (MDS) ならびに主成分分析法 (PCA) により統計解析を行ったところ、サンプルの地理的相違に応じて、明瞭にクラスター化されたことから、氷河堆積物環境の微生物群集は、地理的に特徴的な分布パターンがあることが示唆された。以上のように、本研究を通じてはじめて、これまで不明であった陸域地下圏環境 (氷河堆積物

環境) 中の微生物の群集構造、多様性を高解像度に明らかにした。

(3) イルミナシークエンサーによる陸域地下圏微生物群の多様性解析

上記の 454 パイロシークエンシングは、各種環境中の微生物群を高解像度に解析するのに非常に有効な技術であるが、その一方で、解読コストが高く、多数の環境試料を分析するには困難が生じる。ごく最近になり、イルミナ社製の MiSeq/HiSeq を活用した 16S rRNA 遺伝子の超並列タグシークエンス解析法が提案された。この方法は得られる配列長が 250 bp 以下とやや短い、同じコストで得られる配列量が劇的に増加 (10 倍以上) しており、その有効性が示唆されている。そこで、イルミナシークエンサーによる陸域地下圏微生物の群集構造と多様性解析に挑戦した。特に、その低コスト性から、多数のサンプルを解析することが可能であることから、陸域地下圏環境 (特に氷河堆積物環境) から、DNA だけでなく RNA も抽出し、存在する微生物群 (DNA 解析に基づく)、アクティブに活動する微生物群 (RNA 解析に基づく) の両方について解析を行った。DNA 試料については増幅した 16S rRNA 遺伝子をイルミナ MiSeq でシークエンスし、RNA 試料については一度逆転写を行い cDNA にしてから 16S rRNA 遺伝子を増幅して同様に配列解読を行った。その結果、先の 454 パイロシークエンシング解析の 13 倍を超える総配列量 (190 万 reads 以上) を取得し、1 サンプルあたり 36000~130000 reads の配列を得ることに成功した。配列のクオリティも高く、後段の微生物群集構造解析ならびに多様性解析に供試した。まず、DNA と RNA それぞれから得られた微生物群集構造について比較したところ、予想外にほぼ同じ群集構造であることが明らかとなった。当初、地下圏環境は存在している微生物群とアクティブに活動している微生物群との間に大きな隔りがあると予想していたが、今回の結果は、氷河堆積物地下環境に存在する微生物群は総じてアク

タイプに活動している可能性を示唆している。

次に、今回のイルミナシーケンス解析で得られた微生物群集構造情報をもとに多次元尺度構成法ならびに主成分分析解析を実施したところ、やはりサンプルを採取した地域ごとに明瞭にクラスタリングされることが明らかとなり、地域ごとに特徴的な微生物群集の存在が示唆された。さらに、今回取得した微生物群集構造情報とともに環境メタデータ（地球化学的分析結果）とを統合して、正準相関分析を行ったところ、微生物群集組成の変化と環境メタデータの変動が非常によく関連しており、特に、微生物群集組成がメタン濃度、硫酸濃度、マンガン濃度、アンモニア濃度、溶存有機物濃度と非常によくリンクしていることが明らかとなり、これらの環境因子が同陸域地下圏環境の微生物群集構造を規定する一つの要因になっている可能性が示された。また、上記の環境因子と密接な関連性を示す未知微生物系統群の存在も明らかとなっており、地下微生物群の未知機能の推定につながる重要な基盤的知見が得られている。

（４）陸域地下圏におけるレアバイオスフィアの開拓と未知系統群の発見

今回、陸域地下圏環境の1サンプルあたり30000～130000 readsの16S rRNA 遺伝子配列を取得した。従来のクローン解析では、通常1サンプルあたり100-300 reads程度であることを考えると、今回、100～400倍高い解像度で陸域地下圏環境の微生物群集構造を捉えたことになる。そこで、従来のクローン解析では検出できなかった稀少構成種からなるレアバイオスフィアに着目して、詳細な分子系統解析を実施した。その結果、稀少構成種からなるレアバイオスフィアの多様性は、極めて高いことが明らかとなった。特に、陸域地下環境から検出された全微生物種のうちの多くは、レアバイオスフィアを構成する微生物群であり、個体群としてはマイナーでありつつも、多様性という観点でみると、レ

アバイオスフィアはその環境の生物多様性を維持している重要な生物圏であることが示された。また、こうしたレアバイオスフィアには、遺伝子レベルでも全く知られていない未知の系統群が存在することが示された。こうしたレアバイオスフィアの存在は、陸域地下圏における微生物生態系の頑健性を支える上で重要な役割を果たしているのかもしれない。こうした知見は、従来技術では全く得られないものであり、今回、超高速シーケンス技術と分子生態解析手法を駆使して初めて得られたものである。今後、さらに、国内外の多様な陸域地下圏環境を対象に本技術を適用し、そこに棲息する未知な地下微生物群の群集構造と多様性を解明することにより、陸域地下圏微生物生態系の真の多様性を詳らかにできるものと考えている。

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7件）

- ① Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S: Candidatus Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata, *Microbes and Environ.* 受理済 査読有 <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME12189>
- ② 玉木秀幸: 大量シーケンス情報解析時代の未知微生物探索、*日本乳酸菌学会誌*, 24: 26-33 (2013) jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201202250758318927
- ③ Nakamura K, Takahashi A, Mori C, Tamaki H, Mochimaru H, Nakamura K, Takamizawa K and Kamagata Y: Methanothermobacter

tenebrarum sp. nov., a hydrogenotrophic thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field in Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 715-722 (2013) 査読有 10.1099/ijs.0.041681-0

- ④ Tamazawa S, Takasaki K, Tamaki H, Kamagata Y, Hanada S: Metagenomic and Biochemical Characterizations of Sulfur Oxidation Metabolism in Uncultured Large Sausage-Shaped Bacterium in Hot Spring Microbial Mats, *PLoS One*, 7: e49794 (2012) 査読有 10.1371/journal.pone.0049793.
- ⑤ 玉木秀幸、鎌形洋一: 環境ゲノム情報時代の未知微生物探索研究、*化学と生物*、50: 730-741 (2012) 査読有 <http://ci.nii.ac.jp/naid/40019448213>
- ⑥ Tamaki H, Wright CL, Li X, Lin Q, Hwang C, Wang S, Thimmapuram J, Kamagata Y & Liu WT: Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing platform, *PLoS One* 6: e25263 (2011) 査読有 10.1371/journal.pone.0025263
- ⑦ Nakamura K, Tamaki H, Kang MS, Mochimaru H, Lee ST and Kamagata Y: A six well plate method: less laborious and effective method for cultivation of obligate anaerobic microorganisms, *Microbes Environ.* 26: 301-306 (2011) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME11120>

[学会発表] (計7件)

- ① 山本京介、玉木秀幸ほか: Correlating metabolically active microbial communities with geochemistry in an unexplored terrestrial subsurface environment, glacial deposit、98th Ecological Society of America Annual Meeting、2013年8月4日-9日、ミネソ

タ (米国)

- ② 持丸華子、眞弓大介、吉岡秀佳、坂田将、玉木秀幸、鎌形洋一: Methanogenic diversity and activity in a high-temperature biodegraded oil field、14th International Society for Microbial Ecology、2012年8月21日、コペンハーゲン (デンマーク)
- ③ 竹内美緒、吉岡秀佳、徐維那、田辺晋、玉木秀幸ほか: 関東平野の沖積層において新たに発見された陸域における微生物による嫌氣的メタン酸化活動、第22回環境地質学シンポジウム、2012年12月7日、産業技術総合研究所 (茨城県)
- ④ 玉木秀幸: 大量シーケンス情報解析時代の未知微生物探索、2012年度日本乳酸菌学会秋期セミナー (招待講演)、2012年11月30日、明治大学 (東京都)
- ⑤ 玉木秀幸: Close Encounters of the Third Kind in Microbial Ecology、イリノイ大学環境土木工学科分子生態学セミナー、2012年11月9日、イリノイ大学 (米国)
- ⑥ 玉木秀幸: 第三種接近遭遇 -Close Encounters of the Third Kind in Microbial Ecology-、日本微生物生態学会第28回大会若手交流会 (招待講演)、2012年9月19日、豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ⑦ 持丸華子、眞弓大介、吉岡秀佳、坂田将、玉木秀幸、鎌形洋一: Diversity and activity of methanogenic microbial community in a high-temperature biodegraded oil field、日本微生物生態学会第28回大会、2012年9月20日、豊橋技術科学大学 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉木秀幸 (HIDEYUKI TAMAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 00421842