

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24310150

研究課題名(和文) 東南極の湖沼におけるコケ坊主生物圏のゲノム解析

研究課題名(英文) Genome analysis of biosphere of Moss-pillar in an east Antarctic lake

研究代表者

馬場 知哉 (Baba, Tomoya)

国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進センター・特任教員

研究者番号：00338196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本の南極観測により発見された南極大陸東部の湖沼底に生息する“コケ坊主”と呼ばれる水棲化したコケの生態系の構成細菌を多数分離し、それらのゲノム解析を行った結果、他の大陸における近縁種と比較して水平伝播により獲得された遺伝子が顕著に多い傾向を明らかにした。これは1億5千万年前のジュラ紀には温暖な超巨大大陸 Gondwana の一部であり、大陸移動に伴い他の大陸から分離し、極寒の環境へと変容した南極大陸の生態系における極限環境(低温・凍結、貧栄養、白夜/極夜による極端な日長変化など)への独自の適応進化の一端を反映している可能性を示唆しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：All of living organisms have been adapted to global environmental changes on the Earth. It is meaning that they have been rewriting their own genomic information again and again for their survivals, so it would be the first-step to analyze their genomes for the elucidation of adaptation strategies to their living environment. However, it is remaining unsettled of the genomic evaluation for environmental adaptations and evolutionary relationships among related species on the both polar regions and other continents. In order to address the challenge, we have isolated some of bacteria species from the biosphere of a moss pillar in East Antarctica and analyzed the genomes for focusing comparison with ones of related species from other continents. Consequently it was revealed that a lot of genes showed the feature of transferred ones from other species, crossing the species barriers, “horizontal gene transfer (HGT)” in technical terms of evolutionary biology.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：南極 コケ坊主 微生物 ゲノム 北極 低温 環境適応 水平伝播

1. 研究開始当初の背景

1億5千万年前のジュラ紀には温暖な超巨大大陸ゴンドワナの一部であり、大陸移動に伴い極寒の環境へと変容した南極大陸は98%が氷(氷床)で覆われ、大陸中央の3000mを越える厚さの氷床の解析からは、過去72万年の間に8回の氷期の痕跡が確認されている。南極大陸上の生態系は特徴的な極限環境(低温・凍結、貧栄養、白夜/極夜による極端な日長変化など)に対して独自の適応進化が予想され、日本の南極観測隊が発見した南極大陸東部の湖沼底に生息する“コケ坊主”と呼ばれる水棲化したコケの生態系はその一例である(引用文献)。

コケ坊主はこれまでに最大のもので直径30cm、高さ80cm程であり、群落を構成する植物体としてはナシゴケ(*Leptobryum* 属)が確認されており、これらが密に絡み合って構造体を維持している。一般的にナシゴケ属は陸生のコケ植物であり、南極大陸でのみ水中での群落が観測され、これも南極環境への適応進化の結果と考えられている。C¹⁴の同位体測定による年代推定の結果、頂上から20cm程の部分は約250年前に形成されたことが示唆され、高さ80cmに達するには約1000年の時間が必要と推定された(引用文献)。 *Leptobryum* 属のコケ植物はシアノバクテリアなどの光合成細菌と共生することが知られており、我々はコケ坊主の1群落を上下および内外に14部位に分け、それぞれの部位で細菌16S rRNAライブラリーを構築し、塩基配列を解析したところ、全体としてはProteobacteria門を中心とし、好気的条件下ではCyanobacteria門、嫌気的条件下ではBacteroidetes門などが優先種となることを明らかにすると共に、全体の約90%は新種、約60%が新属あるいは新規な細菌群であることが示唆された(引用文献)。同様に構築した真核生物18S rRNAライブラリーの配列解析からも新規な生物群が多数存在することが示唆され(引用文献)、炭酸固定に関わるRuBisCO遺伝子の解析からは白夜/極夜のそれぞれに関係する遺伝子群の存在がそれぞれ示唆された(引用文献)。

2. 研究の目的

本研究は、南極の湖沼におけるコケ坊主生物圏に着目し、その生態系を構成する微生物のゲノム解析を通じて共生関係やゲノムレベルでの特製の解明により、生物の南極の極限環境への適応や進化、多様性の獲得に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コケ坊主を構成する微生物の分離とゲノム解析

コケ坊主試料から4、10、15でLB培地、グルコース最小培地、BG11培地などの寒天培地上にコロニーを形成する微生物を多数分離し、その16S rRNA配列から分類学的

な考察を行った。さらに、主要な微生物に関しては個別にゲノム解析を行った。

(2) 南極分離株と他の大陸の近縁株との比較ゲノム解析

コケ坊主からの南極分離株でゲノム解析を行った株と他の大陸で分離されゲノム解析情報も得られている近縁種との間で比較ゲノム解析を行い、南極の極限環境への適応や進化に関する考察を試みた。

4. 研究成果

(1) コケ坊主を構成する微生物の分離とゲノム解析

これまでの研究からコケ坊主の生態系は少なくとも564種の微生物(細菌)が関与していることが示唆されている(引用文献)。本研究では、そのうちの12種について分離に成功し、個別のゲノム解析を行った。その結果を表1に示す。

表1 南極コケ坊主からの分離細菌のゲノム解析

分類(門あるいは綱)	菌株名	ゲノムサイズ (Mb)	遺伝子数 (ORFs)
γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. HMP1	6.441	6,057
α-Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp. HMP2	6.605	6,490
	<i>Brevundimonas</i> sp. HMP3	3.238	3,213
β-Proteobacteria	<i>Rhodiferax</i> sp. HMP4	4.264	4,168
Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i> sp. HMP5	3.630	3,371
α-Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp. HMP6	3.637	3,535
β-Proteobacteria	<i>Polaromonas</i> sp. HMP7	4.088	3,900
α-Proteobacteria	<i>Devosia</i> sp. HMP8	4.207	4,126
	<i>Sphingomonas</i> sp. HMP9	3.960	3,586
Actinobacteria	<i>Frigoribacterium</i> sp. HMP10	3.302	3,284
α-Proteobacteria	<i>Phenyllobacterium</i> sp. HMP11	4.388	4,404
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i> sp. HMP12	3.908	3,400

(2) 南極分離株と他の大陸の近縁株との比較ゲノム解析

上記の12種のコケ坊主からの南極分離株と他の大陸の近縁種との間での比較ゲノム解析の結果、エネルギー代謝、炭酸固定、窒素循環に関わる遺伝子群の多くで生物種間での遺伝子の水平伝播が示唆された。窒素循環に関わる遺伝子の水平伝播の例を図1に示す。窒素固定および脱窒反応に関わる7つのマーカー遺伝子の配列情報が南極分離株の5株のゲノム上の11か所に存在したが、そのうち5か所は他の細菌からの水平伝播の可能性が示唆された。

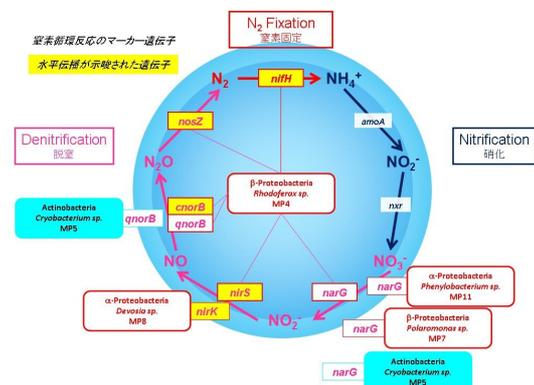


図1 南極コケ坊主細菌のゲノム解析から示唆された窒素循環遺伝子の水平伝播

Rhodoferax sp. HMP4 株では6つのマーカー遺伝子のうち4つで水平伝播による獲得が示唆された。図2に *Rhodoferax* sp. HMP4 株の環状ゲノム構造と窒素固定および脱窒反応に関わる遺伝子群のゲノム上の位置をアメリカ、バージニア州の帯水層から分離された *Rhodoferax ferrireducens* T118 株と比較して示した。*Rhodoferax* sp. HMP4 株が生物分類上の綱(Class)あるいは目(Order)レベルで異なる細菌から窒素循環のマーカー遺伝子だけでなく機能的に関連する遺伝子群をクラスター構造として水平伝播により獲得したこと、ゲノム上の遺伝子全体についても水平伝播により獲得された遺伝子の割合が多いことが示唆された。

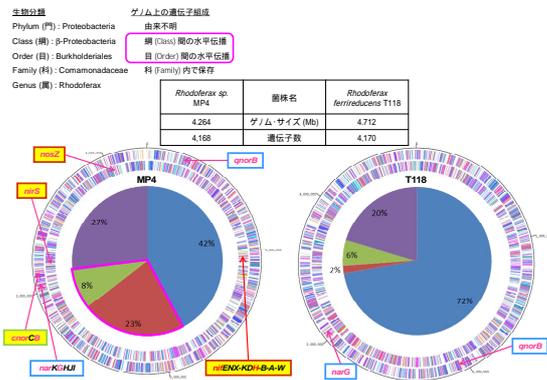


図2 南極コケ坊主細菌 *Rhodoferax* sp. MP4 の環状ゲノム構造と遺伝子組成

細菌における遺伝子の水平伝播に関わる分子メカニズムとして IV 型分泌機構が知られているが、4 株の南極コケ坊主細菌のゲノム上に IV 型分泌機構に関わる遺伝子群のクラスター構造が見出された(図3)。これらの細菌は全て Proteobacteria に分類され、ゲノム上に IV 型分泌機構の遺伝子群クラスター構造が見出されなかった他の 4 株の Proteobacteria とゲノム上の遺伝子組成を比較したところ、IV 型分泌機構の有無で水平伝播により獲得された遺伝子の割合に差異が認められ、IV 型分泌機構による遺伝子供与細菌群から遺伝子受容細菌群への遺伝子の水平伝播の傾向が示唆された。

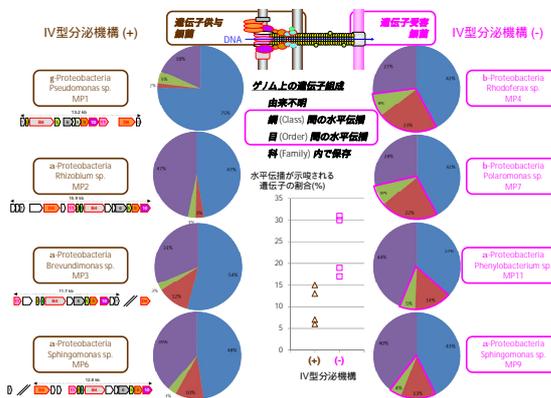


図3 南極コケ坊主細菌におけるIV型分泌機構と遺伝子の水平伝播

以上の結果から、南極のコケ坊主の生態系

においては細菌間での水平伝播によるエネルギー代謝などの機能性遺伝子の分配(Gene-Sharing)や、ある細菌ゲノム上への遺伝子の集積(Gene-Accumulation)により、細菌間での共進化の痕跡が示唆された。

データベース上にある既知の機能性遺伝子のアミノ酸配列の類似性に基づく BLASTP 解析のみでは、データベース上の遺伝子と有意な類似性が認められない場合は判定不能(図2および図3で「由来不明」の表示)となる。そこで、ゲノム上の水平伝播遺伝子の推定に新たな生命情報学的手法を活用し、BLASTP 解析で推定された水平伝播遺伝子の検証と新規の水平伝播遺伝子の発見を試みた。水平伝播遺伝子の推定方法として、連続塩基組成のみに着目することで配列断片を生物種ごとの高精度なクラスタリングを可能にする一括学習型自己組織化マップ (Batch-Learning Self-Organizing Map, BLSOM) に基づいた手法を開発した(図4)。本手法はゲノム配列を 5kb (5,000 塩基) ごとに断片化し、さらに断片化を 1kb (1,000 塩基) ずつスライドさせたゲノム断片配列を用意することで、ゲノム上の全ての 1kb の配列が5つの 5kb 断片配列に含まれ、これらの 5kb 断片配列を2段階の BLSOM により解析した。第1段階は原核生物の Phylum (門) レベルでの推定を行い、第2段階で Phylum ごとに Genus (属) レベルでの推定を行った。ここで、各段階での系統推定はゲノム断片配列が分類されたマップ上の格子点とその周囲 8 点に分類されていた最上位の生物系統とした。

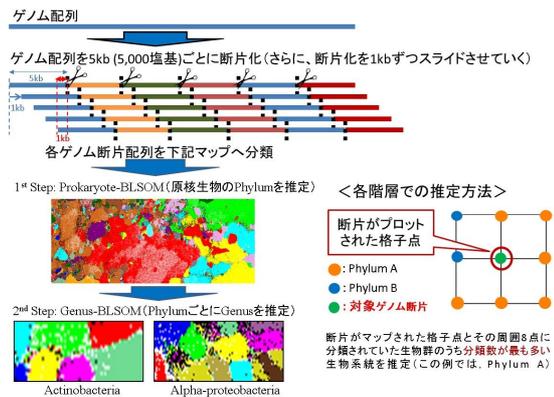


図4 BLSOMによるゲノム上の遺伝子(ゲノム断片)の生物系統の推定方法

BLSOM による推定結果の一例と既存の BLAST 解析との比較を図5に示す。南極コケ坊主から分離され、16S rRNA 配列による系統解析では *Sphingomonas* 属細菌と同定された HMP6 株と HMP9 株は、ゲノムサイズ、ゲノム塩基配列 GC%、遺伝子数などのゲノム組成は相互に似ていたが、遺伝子の塩基配列による解析(BLASTN)では、他の大陸上で分離された近縁種と Genus (属) レベルでの保存性が極めて低く(ゲノム上の全遺伝子の 50%以下)、Family (科)、Order (目) あるいは Phylum (門) レベルでの水平伝播遺伝子の存在が示唆され、40%以上の遺伝子は推定不能(検出

不能；Unknown)であった。遺伝子のアミノ酸配列による解析(BLASTP)では、65%程度の遺伝子で Genus レベルでの保存性が認められたが、25%以上の遺伝子は推定不能であった。BLSOM による推定の結果、これらの多くが Genus から Phylum の各レベルでの水平伝播遺伝子であることが示唆された。なお、BLSOM と BLASTP の結果の一致率は、Genus レベルで 57%、Phylum レベルでは 95%であった。一般に Genus レベルでの水平伝播遺伝子の推定は、種分化(系統分岐)と遺伝子の水平伝播の時期の関係性を考慮する必要がある。例えば、Family レベル以前の分岐時期で水平伝播した遺伝子は、その後の Genus レベルでの分岐により現在の Genus レベルでの推定が困難になることが考えられ、その評価は今後の検討課題である。

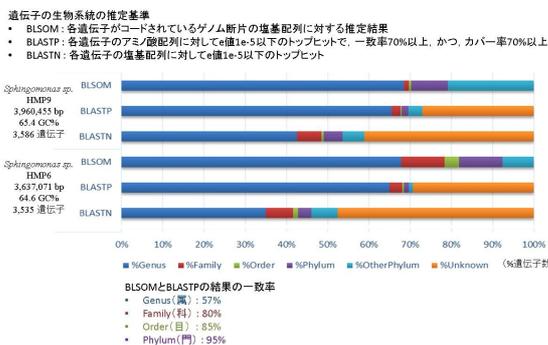


図5 BLSOMによるゲノム上の遺伝子の生物系統の推定結果とBLASTとの比較

BLSOM による南極コケ坊主分離株を含む *Sphingomonas* 属細菌のゲノム断片配列の生物系統の推定の比較を図6に示した。南極コケ坊主からの分離株は2株とも水平伝播が示唆されるゲノム断片配列が30%以上で、他の大陸上の分離株に比べて高いことが示唆された。また、南極コケ坊主分離株の HMP6 株と HMP9 株では水平伝播が示唆されるゲノム断片配列の由来が大きく異なることも示唆された。HMP6 株では Family、Order あるいは Phylum 内での水平伝播が多く示唆されたが、HMP9 株では他の Phylum からの水平伝播が多く示唆された。個別の遺伝子レベルで調べた結果、HMP6 株では α -Proteobacteria 内での水平伝播遺伝子が多く、HMP9 株では β -Proteobacteria の Burkholderia 属からの Phylum (門)を越えた水平伝播遺伝子が多く推定された。これら水平伝播遺伝子の由来および機能の詳細と、南極環境への適応との関連性については今後の検討課題である。

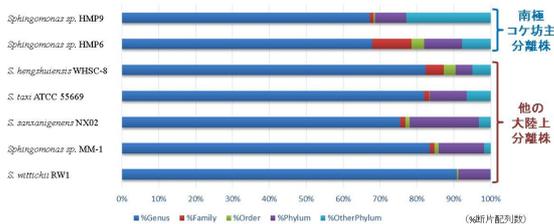


図6 BLSOMによる *Sphingomonas* 属細菌のゲノム断片配列の生物系統の推定

以上の結果から、南極のコケ坊主を擁する湖沼底の生態系は他の大陸とは異なり、進化の過程で遺伝子の水平伝播が高頻度に生じたことが本研究において強く示唆された。これは南極大陸が他の大陸からは隔離され、さらに南極大陸上の湖沼も閉鎖系に近い環境にあるため、そこに存在する生物の生存戦略として限られた遺伝資源を基に生物種間での遺伝子の水平伝播を最大限に活用することで遺伝的な多様性を創出し、生態系内でのエネルギーと物質循環の最適化に沿った共進化が促進されてきた可能性が考えられる。本研究は関連する極域科学の知見も踏まえ、地球環境変動と遺伝子の水平伝播を伴うゲノムレベルでの生物の環境適応・進化に関し新たな知見を与える点で意義があると考えている。

<引用文献>

Imura S, *et al.*, Benthic moss pillars in Antarctic lakes, *Polar Biol.*, **22**, 1999, 137-140

Kudoh S, *et al.*, Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes 1. Macro structure and carbon, nitrogen and chlorophyll a contents, *Polar Bioeci.*, **16**, 2003, 11-22

Nakai R, *et al.*, Microflora of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica, based on fatty acid and 16S rRNA gene analyses, *Polar Biol.*, **35**, 2012, 425-433

Nakai R, *et al.*, Eukaryotic phylotypes in aquatic moss pillars inhabiting a freshwater lake in East Antarctica, based on 18S rRNA gene analysis, *Polar Biol.*, **35**, 2012, 1495-1504

Nakai R, *et al.*, Diversity of RuBisCO gene responsible for CO2 fixation in an Antarctic moss pillar, *Polar Biol.*, **35**, 2012, 1641-1650

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4件)

Higashi K, Kawai Y, Baba T, Kurokawa K, Oshima T, Essential cellular modules for the proliferation of the primitive cell, *Geoscience Frontiers*, 査読有, in press, 2017

DOI: 10.1016/j.gsf.2016.11.013

Nakai R, Fujisawa T, Nakamura Y, Baba T, Nishijima M, Karray F, Sayadi S, Isoda

H, Naganuma T, Niki H, Genome sequence and overview of *Oligoflexus tunisiensis* Shr3^T in the eighth class Oligoflexia of the phylum Proteobacteria, *Stand. Genomic Sci.*, 査読有, **11**, 2016, e00616-16
DOI: 10.1186/s40793-016-0210-6

Nakai R, Fujisawa T, Nakamura Y, Nishide H, Uchiyama I, Baba T, Toyoda A, Fujiyama A, Naganuma T, Niki H, Complete Genome Sequence of *Aurantimicrobium minutum* Type Strain KNC^T, a Planktonic Ultramicrobacterium Isolated from River Water, *Genome Announc.*, 査読有, **4**, 2016, e00616-16
DOI: 10.1128/genomeA.00616-16

Nakai R, Baba T, Niki H, Nishijima M, Naganuma T, *Aurantimicrobium minutum* gen. nov., sp. nov., a novel ultramicrobacterium of the family *Microbacteriaceae*, isolated from river water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 査読有, **65**, 2015, 4072-4079
DOI: 10.1099/ijsem.0.000541

〔学会発表〕(計20件)

赤澤優、阿部貴志、仁木宏典、馬場知哉、遺伝子の水平伝播とアミノ酸組成からみた微生物の南極環境への適応戦略の解明、第11回日本ゲノム微生物学会年会、2017年3月3日、慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、長沼毅、藤山秋佐夫、神田啓史、本山秀明、伊村智、仁木宏典、南極にみる遺伝子の水平伝播ワールド、第39回日本分子生物学会年会、シンポジウム「遺伝情報の水平移動」【招待講演】、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松浦俊一、馬場知哉、千葉真奈美、角田達朗、山口有朋、シリカ系ナノ細孔を利用した1分子DNA増幅技術の開発、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松浦俊一、馬場知哉、千葉真奈美、角田達朗、山口有朋、ナノ空間反応場を利用した1分子DNA増幅システムの構築、第68回日本生物工学会大会、【大会トピックス選出】、2016年9月30日、富山国際会議場(富山県富山市)

阿部貴志、A bioinformatics analysis for efficient knowledge discovery from big sequence data with BLSOM、第89回日本細菌学会年会、シンポジウム「ゲノム解析手法の最前線」【招待講演】、2016年3月24日、

大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Environmental adaptation of polar bacteria; 'To be, or not to be frozen.', 第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016年3月4日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)

阿部貴志、中道真喜、吉田淳一郎、仁木宏典、馬場知哉、BLSOM解析による微生物の南極環境への適応戦略の解明、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016年3月4日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Genomic Evolutions of Polar Bacteria, Interdisciplinary Session "Systematic Analysis for Global Environmental Change and Life on Earth", The Sixth Symposium on Polar Science, 2015年11月19日、国立極地研究所(東京都立川市)

馬場知哉、南極湖沼における遺伝子の水平伝播ワールド、日本進化学会第17回大会、ワークショップ「南極の陸上生物圏の適応進化」【招待講演】、2015年8月21日、中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、長沼毅、藤山秋佐夫、伊村智、神田啓史、本山秀明、仁木宏典、遺南極の湖沼生物圏における遺伝子の水平伝播ワールド、第9回日本ゲノム微生物学会年会、2015年3月8日、神戸大学(兵庫県神戸市)

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Biosphere of an Antarctic Lake as a Natural Laboratory of Biological Evolutions, The Fifth Symposium on Polar Science, 2014年12月3日、国立極地研究所(東京都立川市)

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Bacterial genome-wide horizontal gene-transfers provide co-evolution and adaptation strategies of biosphere in ultra-oligotrophic Antarctic lake, XXXIII SCAR (Scientific Committee on Antarctic Research) Biennial Meetings and 2014 Open Science Conference, 2014年8月28日、オークランド(ニュージーランド)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、

長沼 毅、藤山秋佐夫、伊村智、神田啓史、
本山秀明、仁木宏典、北極・南極 *Pseudomonas*
属細菌のゲノムレベルでの低温環境適応、第
8 回日本ゲノム微生物学会年会、2014 年 3 月
7 日、東京農業大学世田谷キャンパス（東京
都世田谷区）

松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場
知哉、DNA ポリメラーゼ-メソポーラスシリカ
複合体を用いた DNA 増幅法の開発、第 36 回
日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、
神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R,
Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K,
Motoyama H, Niki H, Genome Analysis of a
New Bacterial Species of *Rhizobium*
Isolated from Antarctica, The Fourth
Symposium on Polar Science, 2013 年 11 月
13 日、国立極地研究所（東京都立川市）

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R,
Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K,
Motoyama H, Niki H, Bacterial Genome-wide
Adaptation to a Lake Environment in East
Antarctica, XIth SCAR (Scientific
Committee on Antarctic Research) Biology
Symposium, 2013 年 7 月 19 日、バルセロナ(ス
페인)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、
長沼 毅、藤山秋佐夫、伊村智、神田啓史、
本山秀明、仁木宏典、南極の好冷性 *Rhizobium*
属細菌のゲノム解析、第 7 回日本ゲノム微生物
学会年会、2013 年 3 月 10 日、長浜バイオ
大学（滋賀県長浜市）

松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場
知哉、ナノ空孔反応場を利用した高効率 DNA
増幅システムの構築、第 35 回日本分子生物
学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議
場（福岡県福岡市）

Baba T, Abe T, Toyoda A, Fujiyama A,
Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H,
Genome-wide Environmental Adaptation of
an Antarctic Bacterium, 第 34 回極域生物
シンポジウム、2012 年 11 月 27 日、国立極地
研究所（東京都立川市）

Nakai R, Abe T, Baba T, Imura S,
Kagoshima H, Kanda H, Kohara Y, Koi A, Niki
H, Yanagihara K, Naganuma T, Microfloral
association for nitrogen cycling in an
Antarctic moss pillar inferred from
phylogenetic analyses, 第 34 回極域生物シ
ンポジウム、2012 年 11 月 27 日、国立極地研
究所（東京都立川市）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 知哉 (BABA Tomoya)
国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進セ
ンター・特任教員
研究者番号：00338196

(2) 研究分担者

阿部 貴志 (ABE Takashi)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：30390628

松浦 俊一 (MATSUURA Shunichi)
産業技術総合研究所・化学プロセス研究部
門・主任研究員
研究者番号：80443224

(3) 連携研究者

伊村 智 (IMURA Satoshi)
国立極地研究所・研究教育系・教授
研究者番号：90221788

豊田 敦 (TOYODA Atsushi)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センタ
ー・特任教授
研究者番号：10267495

長沼 毅 (NAGANUMA Takeshi)
広島大学・生物圏科学研究科・教授
研究者番号：70263738