

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660046

研究課題名(和文) 難培養性土壌細菌の分離培養法の確立とゲノム情報収集～メタゲノム研究を支えるために

研究課題名(英文) Establishment of isolation method for non-culturable soil bacteria and genome analyses of the isolates - to support metagenomic studies.

研究代表者

大塚 重人(Otsuka, Shigeto)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10313074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多糖類を用いた新規な培地にて、典型的な難培養性土壌細菌であるヴェルコミクロビア門細菌を分離し、3株のゲノム解析を行った。現在、データベースにて公開する準備を進めている。
また、本研究のデータに、データベースにて公開されている他のヴェルコミクロビア門細菌株のゲノム情報も加え、ヴェルコミクロビア門細菌の保有遺伝子の特徴を探った。その結果、ヴェルコミクロビア門細菌は、他の細菌門に比べ保有する糖代謝関連遺伝子の数が多く、また他の細菌群が殆んど保有していない種類の糖分解酵素の遺伝子も多数保有していることが明らかになり、ヴェルコミクロビア門細菌が多様な糖の代謝ポテンシャルの高い細菌であることが示された。

研究成果の概要(英文)：By using a newly developed polysaccharide containing medium, the present study isolated strains belonging to the phylum Verrucomicrobia, a representative non-culturable group of soil bacteria, and analyzed genome data of three strains. The genome data are going to be registered and published in genome databases in the near future.
The characteristics of the gene compositions of Verrucomicrobia based on the new data as well as already-known data available in genome databases. As the result, it was revealed that Verrucomicrobia generally harbor more carbohydrate-active enzymes than other bacteria, and have genes of many saccharide-degrading enzymes that other bacteria rarely have. It was indicated that Verrucomicrobia is a group of bacteria that has a high metabolic potential for diverse saccharides.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：土壌微生物 難培養性細菌 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

土壤微生物の大部分が既存の手法では培養されないと言われ、そのような難培養微生物の全ゲノムの情報は、データベースから欠落している。近年、環境試料から微生物を分離することなく、試料中の DNA をまるごと大量に解析するメタゲノム解析が行われている。メタゲノム解析では、データベース上の、主に培養株から得られた既存の情報との照合によって、大量に解読された DNA 塩基配列の持ち主や機能を推定する。したがって、土壤のメタゲノム解析に基づく研究にとって、難培養土壤微生物のゲノム情報の欠落は大きな問題となりうる。

たとえば細菌のヴェルコミクロビア門は、土壤細菌が属す代表的な 9 つの門の 1 つであり (ISME J. 2009. 3:305-313) 土壤中の存在量が予想外に多く、時に優占することさえも示されているが (Soil Biol. Biochem. 2011. 43:1450-1455) これまでに分離された培養株が非常に少ないため、データベース上の遺伝情報が不足している。それを原因として、現状では、ヴェルコミクロビア門細菌の機能遺伝子が土壤から検出されたとしても、その持ち主を正しく推定することは困難である。

これを解決するためには、データベースから欠落している培養困難な微生物を分離・培養し、ゲノム情報を解読してデータベースに登録する作業が絶対不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、難培養土壤細菌の分離・培養法を考案する。特殊な装置を用いて難培養微生物を培養しようとする研究が多い中で、本研究では、どこの研究室にもある設備で実現可能な分離・培養法を提案することによって、その手法の普及をはかる。具体的には、次の 2 点を行う。(1) 申請者の過去の研究成果に基づき、様々な多糖を単一炭素源として難培養土壤細菌を効率的に分離・培養する手法を確立する。(2) セルソーターを用い、ゲル培地上で生育しない土壤細菌の細胞を分離した上で、そのドラフトゲノム解析を行う。得られたドラフトゲノム情報を公開し、データベースの拡充に貢献する。

3. 研究の方法

土壤細菌が属す代表的な 9 つの門 (ISME J. 2009. 3:305-313) のうち、土壤にコピキタスに存在しているが、難培養ゆえに培養株が乏しく (あるいは分離頻度が低く) 生態や機能が不明で、ゲノム情報が集積されていないような細菌のうち、本研究では、ヴェルコミクロビア門細菌およびプランクトミセテス門細菌を対象とした。

申請者の過去の研究において、これらの難培養 (または難分離) 土壤細菌が、明条件下・無機液体培地中で緑藻クロレラと共培養されることが示されている (Microbes Environ. 2010. 25: 36-40)。難培養細菌を獲得するた

めには様々な方法があり得るが、本研究では、そのクロレラとの共培養系の特性にヒントを得て、難培養細菌の分離・培養法を考案した。

多糖類を炭素源とする土壤からの難培養細菌の分離・培養とドラフトゲノム解析

藻類が分泌する主要な光合成産物は多糖であること (Biol. Bull. 2004. 31:175-181) を考慮すると、クロレラ培養液中の多糖こそが、上述の共培養系で難培養土壤細菌の炭素源となっていた可能性が高い。よって本研究では、多糖を単一炭素源として難培養土壤細菌を分離・培養する方法を検討した。本研究では、炭素源としてゲランガムを選択した。

ゲランガムでゲル化した無機塩類培地に土壤懸濁希釈液を接種して、細菌を培養した。形成されたコロニーを分離し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて分類同定した。また、一部の株のドラフトゲノム解析を行った。

液体培地を用いた共培養系からの難培養細菌の分離・培養とドラフトゲノム解析

クロレラと共培養されている土壤細菌 (上述) は、様々な細菌群が混在している状態である。申請者の予備実験では、(i) 無機液体培地中では、メンブレンフィルターで互いに隔離された状態でもクロレラと難培養土壤細菌が共培養されるが、(ii) 内部にクロレラを閉じ込めた無機寒天培地上に、その共培養から得られた細菌画分を接種しても、難培養細菌はコロニーを形成しなかった。つまり、これらの難培養土壤細菌は、クロレラの分泌する成分を利用して生育する性質のほかに、寒天上では生育しないが、液体培地でなら生育する性質をもっていると考えられる。

このような難培養土壤細菌の培養法を考案するために、以下の作業を行った。

(1) 共培養系の細菌画分 (土壤由来) を分離源とし、セルソーターを用いて細菌を 1 細胞ずつ、無機液体培地を充填した 96 ウェルプレートに単離した。個々のウェルにクロレラを接種し、ウェルの中でミニスケールの共培養を構築した。

(2) 一定期間、明条件下で培養した後、細菌が増殖しているウェルから特異的 PCR により細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅し、塩基配列を解読して細菌の簡易的な同定を行った。

4. 研究成果

多糖類を炭素源とする土壤からの難培養細菌の分離・培養とドラフトゲノム解析

ゲランガムでゲル化した無機塩類平板培地を用い、水田土壤からのヴェルコミクロビア門細菌の分離を試みた。その結果、ヴェルコミクロビア門 Subdivision 2 に属する 1 株、Subdivision 3 に属する 1 株、および Subdivision 4 に属する 10 株の分離に成功した。申請者の過去の実験で分離された Subdivision 1 の株も合わせると、ヴェルコミクロビア門のうち土壤から検出されやすい Subdivision 1、2、3、4 すべての土壤細

ドラフトゲノム解析に供したヴェルコミクロバシア門細菌3株のゲノム基本情報

ゲノム解析の状態	CG2-4		CG2-6		CG3-38	
	Draft	Draft	Draft	Draft	Draft	Draft
解析総リード数(reads)	77,699	91,114	111,783	111,783	111,783	111,783
解析総塩基数(bases)	48,692,464	56,310,909	69,530,645	69,530,645	69,530,645	69,530,645
コンテナイグ数	295	692	722	722	722	722
コンテナイグ長合計	3,821,008	2,858,534	-	-	-	-
ゲノムサイズ	-	-	-	-	-	-
GC含量(%)	66.55	65.04	60.9	60.9	60.9	60.9
CDS (Coding Sequence) 数	3511	3067	6477	6477	6477	6477
tRNA遺伝子数	45	35	67	67	67	67
rRNA遺伝子オパロン数	1 (16S, 23S, 5S)	1 (16S, 23S, 5S)	1 (16S, 23S, 5S)	1 (16S, 23S, 5S)	1 (16S, 23S, 5S)	1 (16S, 23S, 5S)

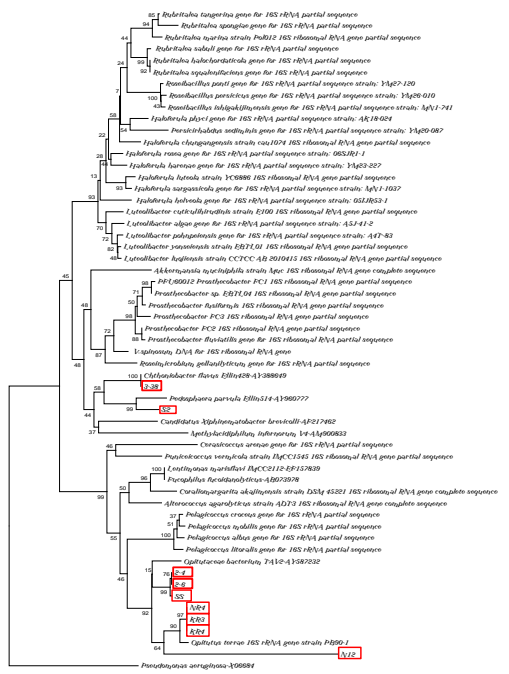


図. 本研究で分離されたヴェルコミクロバシア門細菌(赤い枠の四角で囲まれた株)および近縁種の16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく近隣結合系統樹。

菌を獲得できた。この方法で分離されたヴェルコミクロバシア門細菌の大半が Subdivision 4 に属していたことから、他の Subdivision のヴェルコミクロバシア門細菌は分離されにくい傾向があると考えられた。

次に、分離されたヴェルコミクロバシア門細菌3株のドラフトゲノム解析を行い、そのデータおよびデータベースにてゲノム情報が公開されている他のヴェルコミクロバシア門細菌株について、その保有遺伝子の解析を行った。特に、糖代謝関連遺伝子(CAZymes)に焦点を当てて分析を行った。その結果、Subdivision 2 および 4 は、他の細菌門に比べ保有するCAZymesが極めて多いことが明らかになった。また、保有CAZymesのプロファイルを詳しく分析した結果、他の細菌群がほとんど保有していない糖分解酵素遺伝子も多数保有しているなど、ヴェルコミクロバシア門細菌の糖代謝ポテンシャルの高さや多様性の大きさが示された。

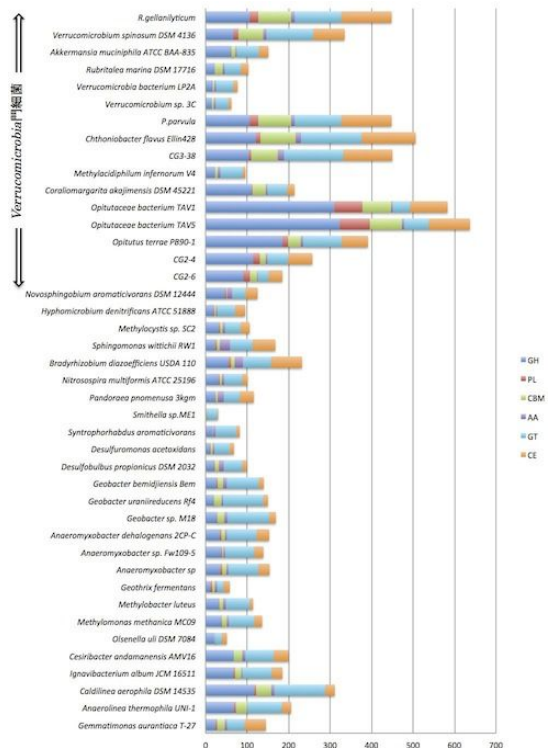


図. ゲノム解析の結果、供試ヴェルコミクロバシア門細菌株および他の細菌群が保有すると推定されたCAZymes遺伝子数。GH、PL、CBM、AA、GT、およびCEはCAZymesの中のグループを表す。

液体培地を用いた共培養系からの難培養細菌の分離・培養とドラフトゲノム解析
二槽培養器を用いたクロレラ-土壌細菌共培養系の中の細菌群の組成を、クローンライブラリー法で解析した結果、その中にたしかにプランクトミセテス門細菌が生存していることを確認した。これらの細菌は、ゲル化した培地の表面に生えないことは過去の研究で確認されている。そこで、セルソーターを用いて液体培地中で単クローンの細菌を分離することを試みた。細菌群より一つずつ分離した細菌を個別にクロレラと共培養し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて所属分類群を同定した結果、プランクトミセテス門に属する複数種の細菌が分離されており、クロレラとの二者培養が構築できていること

が確認された。しかし、この状態でプランクトミセテス門細菌を長い期間培養することができず、やがて培養液から検出されなくなった。クロレラとの共培養で継代されてきたプランクトミセテス門細菌であっても、クロレラと1対1で長期的に培養することは不可能であると思われた。他の細菌の介在によって、はじめてクロレラとの共培養が可能になるものと考えられる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Verrucomicrobia 門に属する新規土壌細菌のドラフトゲノム解析、および糖代謝機能の推定-難培養細菌の土壌生態系機能の解明を目指して-

二関倫太郎、大塚重人、伊藤英臣、磯部一夫、大島健志朗、服部正平、白鳥豊、妹尾啓史
環境微生物系学会合同大会 2014(2014年10月、浜松)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10313074

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：