

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440255

研究課題名(和文)メタン湧水帯に棲息する進化系統学的に極めてユニークな培養困難細菌のメタゲノム解析

研究課題名(英文)Reconstruction of Planctomycete genome with targeted-metagenomics

研究代表者

末永 光 (Suenaga, Hikaru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：90357252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Planctomycetes門に属する細菌群は、近年の16S rDNA配列に基づいた分子生物学的解析によって、広範な環境中に存在していることが知られている。しかしながら、本微生物グループの培養は非常に困難な特性のため、学術的な知見がほとんど得られていない。そこで、メタゲノム解析により、Planctomycetes門細菌のゲノム配列を決定した。この結果、芳香環代謝遺伝子のほか炭素固定、窒素代謝など中心的な代謝経路が確認された。さらに、嫌気的な安息香酸の分解や、糖代謝など二次代謝に関する遺伝子群の存在も明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The overall ecological functions of Planctomycetes have not been studied in depth despite their wide distribution in natural environments. Given that the group are often difficult to culture, a deep understanding of the ecological function of this group would only be accessible by metagenomic approaches. Therefore, a microbial mat from the sediment shelf was analyzed by a targeted-metagenomic approach. The DNA extracted from the microbial mat was pyrosequenced with 454-platform. The degradation genes for Benzoyl-CoA which is one central intermediate of anaerobic aromatic degradation were found in the assembled metagenomic sequences. Other catabolic genes involved in nitrogen cycle were also found. The presented findings indicate that the metabolic diversity of Planctomycetes is wider than currently known.

研究分野：環境微生物

キーワード：メタゲノミクス ゲノムインフォマティクス 難培養微生物 微生物進化 海洋微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Planctomycetes 門に属する細菌群 (以下 *Planctomycetes*) は、近年の 16S rDNA 配列に基づいた分子生物学的解析によって、森林土壌、淡水、海水、シロアリ腸内などの広範な環境中に存在していることが知られている。しかしながら、わずか 12 属 17 種に学名がついているにすぎず (例えば乳酸菌や納豆菌を含む *Firmicutes* 門は 255 属 2475 種が同定されている)、学術的な知見がほとんど得られていない。これは、この微生物グループの培養が非常に困難 (難培養性) な特性のためである。しかしながら、12 属 17 種のわずかな報告例が伝える *Planctomycetes* の生態は、他のいずれの細菌グループとも、際だって異なっている (1)。

たとえば、*Planctomycetes* の細胞構造 (細胞壁、核膜) や生活環 (出芽増殖) は、既知の細菌グループには見られず、むしろ真核生物に共通の細胞性質である。

ゲノム配列には、その生物の生理学的な特徴や進化的な起源に関する情報が記載されている。これまで、培養できない微生物に対するゲノム解析法は皆無であった。ところが 2000 年の初頭において、微生物を培養せずに環境中から直接 DNA を抽出し、遺伝子解析を行う「メタゲノム解析」手法が開発され (2)、培養不可能な微生物についてもゲノム研究の俎上にのぼることになった。

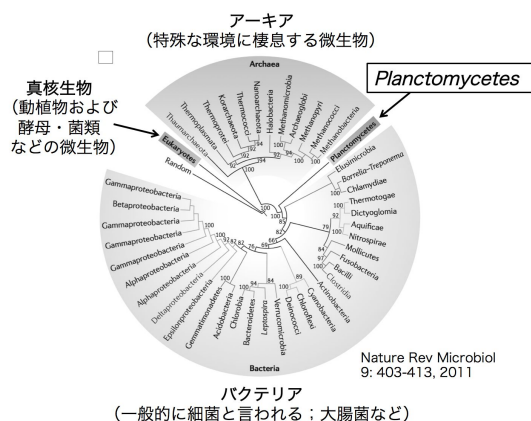


図1: *Planctomycetes* と他の生物群の系統学的関係

2. 研究の目的

メタゲノム解析により、培養困難な *Planctomycetes* 門細菌のゲノム配列を決定

する。また、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 解析により *Planctomycetes* の微生物マット上での局在や存在状況を視覚的に解明する。

以上の結果をもとに、謎に満ちている本細菌の生理的特徴と、環境中での役割および適応進化の謎を解明する。

3. 研究の方法

メタゲノム解析

今回申請者は、雑多な微生物種の集合体である微生物マットの環境 DNA より、目的微生物種のゲノムのみを解析するために、「選択的メタゲノミクス」手法を用いた。バイオインフォマティクス技術を駆使した本手法を実践し、方法論として確立するとともに、*Planctomycetes* 細菌のゲノム配列を決定する。

FISH 解析

FISH 解析により、環境試料中に存在する標的微生物を視覚的に把握できる。そこで、本ゲノム解析により明らかになった *Planctomycetes* の 16S rDNA 配列情報を利用し、FISH 法に最適なオリゴヌクレオチドプローブを設計する。蛍光標識したプローブを作成し、蛍光顕微鏡を用いて *Planctomycetes* の菌細胞を検出し、微生物マット内における本細菌の分布および存在量を計測する。これらは、微生物マットが採取された環境中において、*Planctomycetes* の役割を解明する際の有益な情報となり得る。

4. 研究成果

選択的メタゲノミクス手法の構築

はじめに、メタン湧水帯バイオマットより環境 DNA (メタゲノム DNA) を抽出し、メタゲノムライブラリの構築を行った。

次に、メタゲノムフォスミドライブラリの全ての DNA インサートの両末端の塩基配列 (約 500bp) をキャピラリー型 DNA シーケンサー (ABI 3730xl) により決定した。

続いて、DNA インサートのゲノム DNA 配列決定を行うわけであるが、通常メタゲノム解析では、ライブラリ中の全てのクローンをひとまとめにして、それらを細かく断片化し、次世代シーケンサーを用いてシーケンシングを行う。次に、得られた短い

DNA 配列の共通な配列をつなぎ合わせるこ
と(アセンブリ)により、インサート DNA
の全長を再構築する。しかしながら、通常
は、多種多様な微生物種のゲノム配列が混
在しているため、アセンブリの精度は低く、
ミスアセンブリが起こる可能性も高い。

本研究(選択的メタゲノミクス)におい
ては、あらかじめ配列決定した全ての DNA
インサート末端の塩基配列情報を基に、そ
のインサート DNA の由来微生物を推定し、
目的微生物である *Planctomyces* のみを
選別した。この解析には、研究協力者が開
発したバイオインフォマティクス手法に基
づく系統分類法(3)を利用した。

このようにして選別した約 200 のフォス
ミドクローンについて、次世代シーケンサ
ーを用いた DNA 塩基配列の決定を行った。

Planctomyces 門細菌のゲノム配列の解 析

まず、次世代シーケンサー(454 Life
Science)で得られた配列のクオリティチェ
ックやアダプター配列の除去等の前処理作
業を終えた。同時に、フォスミドクロー
ンのシーケンシングを行っているので、ベク
ター部分の配列の除去作業も行った。次に、
これらを、アルゴリズムが異なる 2 種類の
アセンブラーを用いてアセンブリ作業を行
った。詳細にアセンブリ条件検討を行った
結果、長さや品質において十分なコンティ
グを得ることができた。さらに、アセンブ
リの結果得られたコンティグに対して、別
のバイオインフォマティクス手法を用いて、
由来微生物を推測した。この結果、再度
Planctomyces 属細菌として推測されたコ
ンティグのみを分類選択し、遺伝子解析に
供した。

この結果、芳香環代謝遺伝子のほか炭素
固定、窒素代謝など中心的な代謝経路が確
認された。さらに、嫌気的な安息香酸の分
解や、糖代謝など二次代謝に関する遺伝子
群の存在も明らかになった。

また、ANAMMOX(嫌気性アンモニア酸化)
細菌とは、系統学的にも代謝反応におい
ても異なる微生物群に属することが明らか
になった

FISH 解析

FISH 解析を行うことにより、環境試料中
における、*Planctomyces* 属細菌の分布お
よび存在量について計測した。

はじめに、16S rDNA のデータベースであ
る SILVA database

(<https://www.arb-silva.de>) および ARB
プログラム

(<http://www.arb-home.de/home.html>) を
用いて、*Planctomyces* 属細菌に特異な配
列を持つオリゴヌクレオチドプローブを設
計した。蛍光標識したプローブを作成し、
蛍光顕微鏡を用いて検出した。ここで、実
験に使用した環境試料については、通常の
FISH 法においては、十分なシグナルが検出
できなかったため、HRP(Horseradish
peroxidase)の触媒作用を利用してシグナ
ルを増幅する TSA(Tyramide Signal
Amplification)反応を用いた CARD

(Catalyzed Reporter Deposition)-FISH
法を用いた。この結果、本環境においては、
地球上における他の環境よりも、はるかに
Planctomyces 属細菌の存在量の多いこと
が確認された。

環境資料中における分布の状態および代
謝パスウェイの遺伝子解析の結果より、本
微生物マットに棲息する *Planctomyces*
属細菌群は、海底付近の嫌気的な環境下
において、窒素循環に関与していることが示
唆された。

[参考文献]

- (1) Nature Reviews Microbiology, 9:
403-413, 2011.
- (2) Nature, 455: 481-483, 2008.
- (3) Science, 336: 608-611, 2012.

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5件)

- (1) Suenaga H., Yamazoe A., Hosoyama A.,
Kimura N., Hirose J., Watanabe T.,
Fujihara H., Futagami T., Goto M.,
and Furukawa K.

Complete genome sequence of the
polychlorinated biphenyl-degrading
bacterium *Pseudomonas putida* KF715

- (NBRC 110667) isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announcement. 2017. 5(7), e01624-16. doi: 10.1128/genomeA.01624-16
- (2) Matsuzawa T., Kimura N., Suenaga H., and Yaoi K. Screening, identification, and characterization of -xylosidase from a soil metagenome. J. Biosci. Bioeng. 2016. 122(4): 393-9. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.012
- (3) Suenaga H. Targeted metagenomics unveils the molecular basis for adaptive evolution of enzymes to their environment. Frontier in Microbiol. 2015. 6: 1018. doi: 10.3389/fmicb.2015.01018.
- (4) Suenaga H., Mizuta S., Miyazaki K., and Yaoi K. Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. FEMS. Microbiol. Ecol. 2014. 90: 367-379. doi: 10.1111/1574-6941.12390.
- (5) 末永光
メタゲノム手法は微生物培養法を凌駕するのか？-未開拓遺伝子資源アクセスツールとしてのパフォーマンス比較 -
化学と生物 (日本農芸化学会誌) 2016. 53(8): 488-490.

〔学会発表〕 (計4件)

- (1) Suenaga H., Miyazaki K., and Yaoi K. Which is a better approach for enzyme exploration? : culture-dependent and -independent (metagenomic) approaches to the screening for aromatic-degrading enzymes. 2016/8/25. International Society for Microbial Ecology. Motreal (Canada)
- (2) Suenaga H., Miyazaki K., and Yaoi K.

Which is a better approach for enzyme exploration? : culture-dependent and -independent (metagenomic) approaches to the screening for aromatic-degrading enzymes. 2015/6/10. Maastricht.

- (3) Suenaga H., Huang S., Schauer R., Teeling H., Meyerdierks A., and Amann R.
メタゲノム解析により推察される大西洋熱水噴出域に棲息する微生物群の環境適応戦略
2015/7/20. NGS 現場の会. つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
- (4) 末永光, 水田志織, 宮崎健太郎, 矢追克郎
メタゲノム手法と培養法: 酵素遺伝子スクリーニングのための手法間の比較解析
2014/10/23. 環境微生物系学会合同大会. 浜松会議場 (静岡県浜松市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永 光 (SUENAGA, Hikaru)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号: 90357252