

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05620

研究課題名(和文) 濾過性細菌が持つ新生物機能を理解する

研究課題名(英文) Elucidating the physiological and ecological traits of filterable bacteria

研究代表者

中井 亮佑 (Nakai, Ryosuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90637802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、除菌フィルターを通過するほどに小さな濾過性細菌に焦点を当て、その種多様性や新生物機能を網羅的に調べた。その結果、これまで看過されてきた極小サイズの細菌群が潜在的に様々な代謝機能(窒素循環に関わる生態特性や抗生物質の耐性能等)を持つことが判明した。また並行して環境DNA解析も行ったところ、フィルター濾液画分に新奇系統群が検出されたことから、従来、未培養細菌あるいは難培養細菌と考えられていたものの少なくとも一部は、環境中で極小微生物として存在することが高い蓋然性で示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の最小サイズは一般に0.2マイクロメートル前後とされ、医薬・食品業界や生物学諸分野において孔径約0.2マイクロメートルのフィルターを用いた濾過除菌が汎用される。本研究はこの除菌フィルターを通過する新規な極小細菌群を網羅的に調べたことに学術的意義がある。同時に、そこにユニークな生物機能を有する細菌が見出されたことから、今後の生物資源・遺伝子資源の探索において、濾過性細菌が有力候補の一つになることが明確化したことにも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The occurrence of ultra-small filterable bacteria capable of passing through 0.2-micrometer-pore-size filters has been reported recently. In this study, we determined the growth characteristics, physiological and biochemical properties, and genomic structures of two representative filterable strains (novel alphaproteobacterium IZ6 and *Oligoflexus tunisiensis* Shr3), isolated from terrestrial environments. As a result, functional genes involved in nitrogen cycle, such as nitrogen fixation and denitrification, were detected from the genome information, and the nitrogen fixation ability was confirmed by a culture experiment using the novel strain IZ6. Furthermore, metagenomic analysis of filterable bacterial populations present in environmental samples revealed the existence of novel metabolic pathways in uncultured lineages. Thus, it was disclosed that microorganisms with novel biological functions exist in the neglected filterable fraction.

研究分野：微生物学

キーワード：応用微生物 微生物生態

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 私の関心は特殊環境微生物の系統と生態であり、これまでに北極、南極、深海、高温泉などに生息する微生物を調べてきた。また、環境の極限ではなく、「生物サイズの極限」としての極小微生物の探索にも取り組んできた。極小サイズの微生物を分離するため、濾過滅菌（除菌）に汎用される孔径約0.2マイクロメートルのフィルターを用いて様々な環境試料を濾過し、その濾液からフィルターを通り抜ける程に小さな濾過性細菌の純粋培養を試みた。

(2) その結果、河川水のフィルター濾液から終生を極小サイズで過ごす（細胞体積が大腸菌の10分の1程度）アクチノバクテリア門の新種候補を分離した。また一方で、実験室での培養後には細胞サイズが10マイクロメートル以上に大きくなる糸状細菌も砂れき懸濁液のフィルター濾液から培養された。この菌株は、顕微鏡下で螺旋状や小さい球状の細胞も観察され、生活史の一部に矮小化ステージがあると考えられた。さらに、この株は系統学的新規性が極めて高く、プロテオバクテリア門の新綱分類群を代表する新種として記載した。これら2種の濾過性細菌の16S rRNA 遺伝子（系統分類に汎用される遺伝子領域）は、世界各地の様々な環境から報告されている未培養細菌由来のrRNA 配列と高い相同性を示したことから、濾過性細菌の広範囲な分布が予想された。

(3) 以上のように、環境中の濾過性細菌の存在が確実視されてきたものの、それらが環境中でどのように振る舞っているのか、その生態学的機能は全くの不明であった。そのため、これまでに確立した純粋分離株やフィルター濾液画分より抽出する環境ゲノム等を用いて、従来看過されてきた濾過性細菌の実態を追及する研究を計画した。

2. 研究の目的

先述した研究背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では、濾過性細菌の持つ新しい生物機能を解明することを目的とした。環境微生物の多くは難培養であるため、本研究で調べる純粋分離株の機能情報が自然環境中の濾過性細菌「群集」としての生態機能と関連付けられるかは自明ではない。しかし、本研究のような通常微生物が除去された「0.2マイクロメートル通過画分」から取得する生物学的知見は、今後、環境微生物の多様性や機能を評価するうえでの貴重な基礎情報になると考えた次第である。

3. 研究の方法

(1) 私が保有する濾過性細菌ライブラリ（様々な分離源に由来する菌株を含む）を活用して、その生理・生化学的性状を精査した。特に、陸上環境から単離したプロテオバクテリア門の新規細菌2種（novel alphaproteobacterium IZ6 および *Oligoflexus tunisiensis* Shr3）を重点的に調べた。具体的には、嫌気性・好気性、代謝基質の資化性、生育至適な温度・塩分・pH等、生態学的特性を考究するうえで重要な情報を収集した。

(2) 生理・生化学的性状試験と並行して、各菌株のゲノム概要配列を取得した。菌体から十分量のゲノムDNAを抽出した後、illumina社シーケンサー（HiSeq）やPacBio社シーケンサーを用いてそのゲノム情報を解読した。次に、遺伝子機能付与（アノテーション）を行うとともに、ゲノムワイドな分子系統樹も構築することで、濾過性細菌株の系統的な位置および代謝特性を特徴付けた。

(3) 本研究では、培養法に依存しない環境DNA解析（メタゲノム解析等）によって濾過性細菌の多様性と機能を網羅的に調べることに挑戦した。具体的には、環境試料を孔径約0.2マイクロメートルのフィルターで濾過し、その濾液中の濾過性細菌を孔径0.1マイクロメートルのフィルターで捕集した。フィルターからのDNA抽出条件を最適化してプロトコルを確立するとともに、メタゲノム解析、ゲノム再構築法（ビニング）およびアノテーションを行い、新規な濾過性微生物が有する潜在機能を推定した。

4. 研究成果

(1) 国内土壌から頻度高く分離される濾過性細菌系統から菌株IZ6を選抜し、その代謝基質の資化性や酵素活性に関するデータを取得した。また、その16S rRNA 遺伝子の塩基配列にもとづく分子系統解析より、本菌株がアルファプロテオバクテリア門において少なくとも新属を代表する新規分類群であることがわかった。また、そのゲノム解析の結果、ゲノムサイズは約3.1Mbpと比較的小さく、そのうちタンパク質をコードする領域は3,022個、また、タンパク質の合成に関わるrRNA オペロンは1個のみが存在した。さらに、ゲノム中に窒素固定に関わる機能遺伝子見出されたので、その機能活性を培養実験で確認した。

(2) 砂漠産砂礫から分離した濾過性細菌 *Oligoflexus tunisiensis* Shr3^T を用いて、パイオログ社のオムニログシステムを活用しながら、増殖特性や基質資化性・酵素活性に関するデータを網羅的に取得した。また、そのゲノム解読の結果、ゲノムサイズは約 7.6 Mbp と比較的大きいことがわかった (右図 1)。ゲノム中には好気呼吸に関わる複数の末端酸化酵素や、異化型硝酸呼吸に関連する酵素をコードする機能遺伝子群が見いだされ、多様なエネルギー獲得機構を持つことが明らかとなった。加えて、多剤薬剤耐性に関わる RND 型異物排出システムをコードする領域も見られた。これらの結果を整理し、各種雑誌で論文公表した (後述の雑誌論文⑥等)。

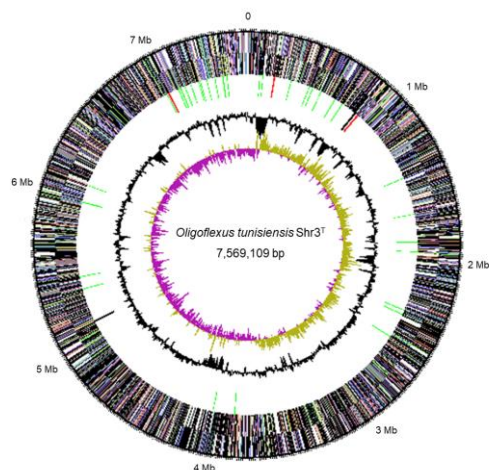


図1. 砂漠産の濾過性細菌株Shr3のゲノム構造
Oligoflexus tunisiensis は約7.6 Mbpの比較的大きなゲノムをもち、ゲノム中には窒素除去プロセスに関わる脱窒関連酵素群がコードされていた。

(3) 前述の *O. tunisiensis* Shr3^T と近縁細菌の比較ゲノム解析を行ったところ、ゲノムワイドな比較により、幾つかの既知系統、具体的には捕食細菌を含むことで有名な *Bdellovibrionales* 等が *Oligoflexia* グループ

(*O. tunisiensis* Shr3^T をもとに記載提案したプロテオバクテリア門内の新綱) に帰属することが明らかとなった。その成果の一部は、国際共同研究として論文を公表した (後述の雑誌論文③)。

(4) 濾過性細菌を標的としたメタゲノム解析の結果、推定上候補門 (candidate division) や未培養系統群に属する新規微生物のゲノムを複数獲得するとともに、その遺伝子機能を推定した結果、中にはユニークな生体物質合成系および代謝系を有するものが見出された。成果の一部は、国際学術誌に投稿し、現在その査読対応を行っている。新奇系統群がフィルター濾液画分から複数検出されたことから、従来、未培養細菌あるいは難培養細菌と考えられていたものの少なくとも一部は環境中で極小微生物として存在することが高い蓋然性で示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① 中井 亮佑、とつても小さいやつらを追って—謎だらけの「辺境微生物」の世界、講談社ブルーバックス・ウェブサイト、1/2~2/2 頁、<https://gendai.ismedia.jp/articles/-/60157?media=bb>、2019. 査読無し
- ② 中井 亮佑、精密ろ過膜を通り抜ける「ろ過性細菌」、バイオサイエンスとインダストリー (B&I)、77 巻、56~57 頁、https://www.jba.or.jp/bi_index/2019/2019_vol77_no1.php、2019. 査読無し
- ③ Hahn MW, Schmidt J, Koll U, Rohde M, Verbag S, Pitt A, Nakai R, Naganuma T, Lang E, *Silvanigrella aquatica* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, description of *Silvanigrellaceae* fam. nov. and *Silvanigrellales* ord. nov., reclassification of the order *Bdellovibrionales* in the class *Oligoflexia*, reclassification of the families *Bacteriovoracaceae* and *Halobacteriovoracaceae* in the new order *Bacteriovoracales* ord. nov., and reclassification of the family *Pseudobacteriovoracaceae* in the order *Oligoflexiales*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2555-2568, doi:10.1099/ijsem.0.001965, 2017. 査読有り
- ④ 中井 亮佑、玉木 秀幸、超微小微生物の実態と多様性、日本微生物生態学会誌、32 巻、43~50 頁、doi:10.20709/jsmeja.32.2_43、2017. 査読無し
- ⑤ 中井 亮佑、超微小バクテリアは何者か?、生物工学会誌『バイオメディア』、95 巻、405 頁、https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9507/9507_biomedica_5.pdf、2017. 査読無し
- ⑥ 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*, *Standards in Genomic Sciences*, 11, 90, doi:10.1186/s40793-016-0210-6, 2016. 査読有り

⑦ 中井 亮佑、小さいサイズの極限—生物はどこまで小さくなるのか、生物の科学 遺伝、70巻、199～203 頁、<http://iden.thebase.in/items/3109947>、2016. 査読無し

〔学会発表〕（計 18 件）（うち招待講演 13 件）

① 中井 亮佑、極域ハビタットにおける微生物探索のこれまでとこれから、極域大気～アイスコア中の微生物に関する研究集会、国立極地研究所、2019. 招待講演

② 中井 亮佑、新時代における微生物の探索と利活用、2018 年度 第 6 回 HiNT セミナー、R&B 札幌大通サテライト、2018. 招待講演

③ Nobu MK, Nakai R, Tamazawa S, Mori H, Toyoda A, Ijiri A, Suzuki S, Kurokawa K, Kamagata Y, Tamaki H, New candidates for acetogenesis in early Earth, Hadean Bioscience International Symposium 2018, Akihabara Urban Development X, 2018. 招待講演

④ Nakai R, Nobu MK, Tamazawa S, Mori H, Toyoda A, Ijiri A, Suzuki S, Kurokawa K, Kamagata Y, Tamaki H, Unique acetogenic microorganisms inhabiting the serpentinite-hosted Hakuba Happo hot spring, Hadean Bioscience International Symposium 2018, Akihabara Urban Development X, 2018.

⑤ 中井 亮佑、レアな環境微生物群の探索と資源化、平成 30 年度育志賞研究発表会、弘済会館、2018.

⑥ 中井 亮佑、堀江 真行、未知なる微生物を求めて—南極生態学とウイルス学の融合—、平成 30 年度育志賞研究発表会、弘済会館、2018. 招待講演

⑦ Nakai R, Fascinating microorganisms in extreme environments, Seminar at Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences (CAS), 2018. 招待講演

⑧ 中井 亮佑、辺境微生物たちの実態を探る、甲南生物学セミナー／博学プロジェクトセミナー／統合ニューロバイオロジー研究所セミナー、甲南大学、2018. 招待講演

⑨ 中井 亮佑、超微小微生物の実態と新機能の追究、平成 29 年度育志賞研究発表会、大阪大学、2017.

⑩ 中井 亮佑、超微小細菌のしなやかな生存戦略に学ぶ、第 90 回日本細菌学会総会、仙台国際センター、2017. 招待講演

⑪ Nakai R, Tsujimoto M, Suzuki AC, Kudoh S, Imura S, Niki H, Unique bacterial phylotypes in a meltwater pond in Inhovde, East Antarctica, The Seventh Symposium on Polar Science, National Institute of Polar Research, 2016.

⑫ 中井 亮佑、辺境に生きる微生物たち、第 278 回生態研（京大大学生態学研究センター）セミナー、京都大学、2016. 招待講演

⑬ 中井 亮佑、極限環境生物の研究で求められるもの、平成 27 年度日本水産学会九州支部大会 AYSK2015、宮崎大学、2015 招待講演

⑭ Nakai R, The 7th Japan-Taiwan-Korea International Symposium on Microbial Ecology, Tsuchiura City Kijo Plaza, 2015. 招待講演

⑮ 中井 亮佑、辺境微生物ゲノムから見えてきたもの、第 9 回日本ゲノム微生物学会若手の会、八王子セミナーハウス、2015. 招待講演

⑯ 中井 亮佑、極限環境に生きる微生物たち、日本学術振興会 育志賞受賞者研究発表会、京都大学、2015.

⑰ 中井 亮佑、極小細菌から探る微生物の進化、日本進化学会第 17 回東京大会、中央大学、2015. 招待講演

⑱ 中井 亮佑、辺境微生物たちの世界、アドバンス生命理学特論 IGER セミナー、名古屋大学、2015. 招待講演

〔図書〕（計 2 件）

① Nakai R, Imura S, Naganuma T, Patterns of microorganisms inhabiting Antarctic freshwater lakes

with special reference to aquatic moss pillars, In: Castro-Sowinski S (eds) *The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment*, pp.25-43, Springer Polar Sciences. Springer, Cham, doi:10.1007/978-3-030-02786-5_2, 2019. 査読無し

② 中井 亮佐、追跡！辺境微生物 砂漠・温泉から北極・南極まで、204 頁、築地書館、<http://www.tsukiji-shokan.co.jp/mokuroku/ISBN978-4-8067-1571-9.html>、2018. 査読無し

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
該当なし

○取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕

① Researchmap

<https://researchmap.jp/rnakai/>

② ホームページ

<https://sites.google.com/site/nakaiwebsite/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
該当なし