

令和元年6月6日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07529

研究課題名(和文) 水銀耐性細菌を指標にする「細菌の分散と環境による選択」の検証

研究課題名(英文) Evaluation of "everything is everywhere" hypothesis using mercury resistance bacteria as tracer microorganism

研究代表者

松井 一彰 (MATSUI, Kazuaki)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：40435532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の空間分布については経験や観察を基にした仮説が存在するが、その検証は進めてこられなかった。本研究では、仮説の域を超えなかった細菌の地理的分布について、データを基にした検証を試みた。世界各地の土壤中よりバチラス属水銀耐性細菌を分離して水銀耐性トランスポゾン解析したところ、同一のトランスポゾンを持つ同属の細菌が異なる地点間で見つかった。また同一のトランスポゾンが、別の属の細菌より見つかったことから、水銀耐性トランスポゾンがバチラス属細菌間で水平伝播されていることも示唆された。さらに水銀を含む培地での土壤培養によって、各地点の水銀耐性細菌が全て検出可能な量まで増加することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大型の生物と違って、肉眼での観察が難しい微生物の移出入や新しい環境への定着機構については不明な点が多い。そこでバチラス属水銀耐性細菌を指標に細菌や遺伝子の動態を解析することで、これまで仮説に留まっていた微生物の移動実態を実証することを試みた。微生物の環境中の動態を明らかにすることは、微生物の動態に関わる様々な課題(薬剤耐性細菌の環境中での動態、病原性微生物の拡散、下水越流が河川水に及ぼす衛生面)に科学的に対応する上での重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：In microbial ecosystems, the hypotheses of environmental selection and dispersal limitation are the most likely explanations for how new ecosystems form. However, the interactions between these two phenomena are not well characterized. To test the "everything is everywhere but the environments select" hypothesis, mercury resistant spore-forming Bacilli were isolated from different geographical regions in order to understand the dissemination of mercury resistance transposons across related Bacilli genera. Tn5084, originally identified from *B. cereus* strain RC607 from the USA, is identified from *Bacillus* isolated from Asia and Europe. Newly identified transposons Tn6294 and TnMER3 were also identified in soils from different continents. The Soil cultivation with mercury containing media leads to the enhancement of mer genes. The results obtained here indicated that the horizontal dissemination of mercury resistance transposons in the Bacilli.

研究分野：微生物生態学

キーワード：水銀耐性 Bacilli 微生物の分散 遺伝子水平伝播

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肉眼にて個体の移動が確認できる大型生物と違い、体サイズが小さな細菌の移動実態は未だ解明されていない。細菌種の多様性と地理的分布の議論においては、1934年にオランダの微生物学者 Baas Becking が提唱した “*everything is everywhere, but the environment selects*” 仮説が良く引用される。この仮説では「その分散能力の高さから、細菌はすでにあらゆる場所に到達しているため、群集構成種の地理的な変異は小さい。しかし(but)、環境条件の違いが、場所毎に優先する細菌種の違いを生じさせている」と説明する。他方 “*dispersal limitation*” 仮説では「細菌の分散範囲には限界があり、移出入が制限されていることが、場所毎の微生物多様性の創出につながっている」と説明する。

細菌の地理的分布における研究では、細菌の分類で汎用される定義である「16SrRNA 遺伝子配列に 97%以上の同一性がある」ことを同種の根拠として、上記いずれかの仮説を支持する報告例が多い。しかし細菌においては炭疽菌とセレウス菌のように 16SrRNA 遺伝子の配列だけでは分類が不可能な事例がいくつもあり、細菌の種を 16SrRNA 遺伝子配列の同一性のみで判断するには限界がある。

また細菌では、「生物体の移動・分散」と独立して「機能遺伝子の移動・分散」を可能にする遺伝子の水平伝播現象がみられるため、「個体」だけではなく「機能遺伝子」の移動・分散によっても生態系機能が特徴づけられる。よって微生物生態系の構造や機能の理解を深めるには、未だ仮説の域を出ない細菌の移入と遺伝子の分散頻度について、実証的な解明を進めることが重要である。

2. 研究の目的

微生物の空間分布については、経験や観察を基にした仮説が存在するが、その検証は進めてこられなかった。その主な理由として、(1) 微生物多様性の創出や維持機構に研究の関心が集まり、仮説を再度検証する動機づけが低かったこと、(2) 株レベルでの検出が簡易で、遺伝子の水平伝播についても同時に確認できる、理想的な「モデル細菌」を見つけられなかったことが挙げられる。本研究では、パチラス属水銀耐性細菌とトランスポゾン *TnMERII* を用いてこれまでの実験的な制約を克服し、仮説の域を超えなかった細菌の地理的分布について、データを基にした検証をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 世界各地の土壌中に生息するパチラス属水銀耐性細菌を分離し、トランスポゾン(*TnMERII*) と 16srRNA 遺伝子配列の相同性から、同菌の地理的分布を明らかにする。

- ① 申請者と研究協力者の Silver 教授が持つ世界各地の土壌サンプル(約 50 地点)を対象に、水銀寒天培地を用いてパチラス属水銀耐性細菌を分離する。
- ② 分離した細菌より DNA を抽出し、LA-PCR 法にて水銀耐性トランスポゾン *TnMERII* を持つことを確認する。
- ③ 分離した細菌のトランスポゾン配列の塩基を決定し、分類する。トランスポゾン配列が決まった細菌については 16SrRNA 遺伝子配列を決定し、種の同定もおこなう。
- ④ トランスポゾン配列と 16SrRNA 遺伝子配列を基にして、各サンプリング土壌中における *TnMERII* を持つパチラス属水銀耐性細菌を区分し、同一株の分散範囲をマッピングする。

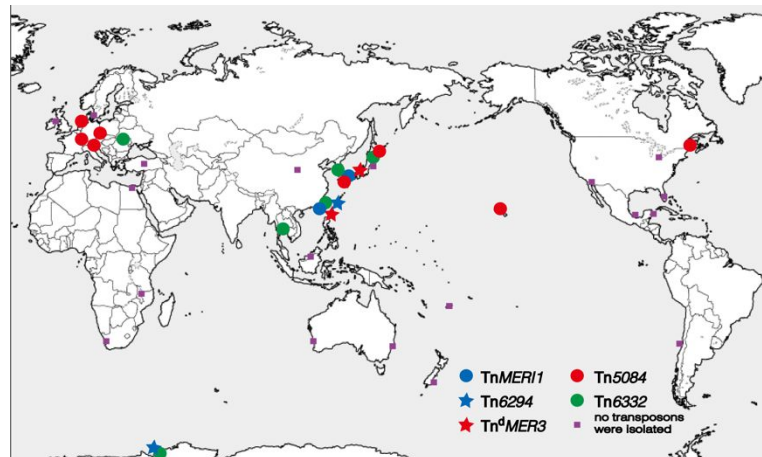
(2) 「野外土壌由来の実験生態系」を用いて、移入先の微生物群集内にパチラス属水銀耐性細菌が定着する環境条件を評価する。

- ① 「野外土壌由来の実験生態系」に TnMER11 を持つバチルス属水銀耐性細菌を導入し、TnMER11 を対象とした定量 PCR 法を用いて水銀耐性細菌数を特定する。
- ② 実験生態系の環境因子(温度や土壌のタイプ)を変化させながら上記の実験を進め、バチルス属水銀耐性細菌の定着に関わる環境条件を評価する。
- ③ 実験生態系内に加えた無機水銀の減少率から水銀耐性機能の定着と水銀除去効率を評価する。

4. 研究成果

共同研究者の Silver 教授が持つ世界各地の土壌中よりバチラス属水銀耐性細菌を 65 株分離し、そのうち 12 株が TnMER11 型のトランスポゾンを持つことを明らかにした。見つかったトランスポゾンの遺伝子型を解析したところ、4 つの型 (Tn5084 型、Tn6332 型、Tn6294 型、Tn^dMER3 型) に区分できた (図 1)。

図 1. 本研究で見つかった TnMER11 型のトランスポゾンを持つバチラス属水銀耐性細菌の分布図。同一のトランスポゾンを持つ同属の細菌が、異なる地点間で見つかった事 (例えば Tn5084 型トランスポゾンを持つ *Bacillus* 属細菌が北米、アジア、欧州で発見) から、同じ水銀耐性細菌が世界に分散していることが示唆された。また同一のトランスポゾン (Tn6294 型) が、別の属 (*Bacillus* 属と *Paenibacillus* 属) の細菌より見つかった事から、TnMER11 型の水銀耐性トランスポゾンが細菌間で水平伝播されていることが示唆された。



Tn5084 型は以前、米国のボストン湾底泥より分離された *Bacillus cereus* RC607 株より報告されていたトランスポゾンである。同一のトランスポゾンがハワイ、日本、韓国、オランダ、イタリア、スイスの土壌からも見つかった事から、世界のバチラス属水銀耐性細菌間に広く分布しているトランスポゾンだと考えられた。

Tn6332 型は、台湾から分離された *Bacillus* sp. TW6 中より同定されたトランスポゾンである。過去にウクライナの鉱山で分離された *Exiguobacterium* sp. TC38-2b より、一部の配列のみ同定されていた Tn5085 型トランスポゾンと相同であることが明らかになり、本研究によって、これまで全容がわからなかった Tn5085 型トランスポゾンが解明されたことになる。またこの事実から、Tn6332 型 (=Tn5085 型) は、地理的に異なる場所の異なる属の細菌間で伝播していることも明らかにできた。

Tn6294 型は、これまでに報告がされていないタイプであったが、その配列の解析から、Tn^dMER3 型にトランスポゾン遺伝子が挿入されて形成されたトランスポゾンである可能性を示した。また Tn6332 型 (=Tn5085 型) は、Tn6294 型を基に構築されていた可能性が高い。

Tn^dMER3 型は IR 配列を持つ一方で、転移に必要なトランスポゼースを含まない「不完全」なトランスポゾンである。今回は、Tn^dMER3 型を持つ同属の細菌が日本と台湾から見つかっており、これらの細菌が何らかの形で分散している可能性が示された。

また全 75 地点の土壌サンプルを対象に、土壌中に含まれるバチラス属水銀耐性細菌の水銀耐性遺伝子を定量解析した。対象としたのは、還元酵素遺伝子 (*merA*) と有機水銀分解酵素 (*merB1*) である。しかし 75 箇所中わずか 15 箇所からしか水銀耐性遺伝子を検出できなかった。しかし、土壌を有機栄養培地 (LB) 培地で培養すると、全ての土壌よりこれらの遺伝子を検出することが出来た。さらに無機水銀を含む LB 培地中にて培養を行った場合は、検出される遺伝子量が平均 100 倍以上増加した。以上の結果より、土壌中には少量 (1g の土壌中に 1000 細胞以下) のバチルス属水銀耐性細菌が休眠状態で普遍的に分布しており、栄養塩の流入や水銀の存在などによって選択されると、その存在量が劇的に変化する事を実験的に確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

K. Matsui, and G. Endo. 2018. Mercury bioremediation by mercury resistance transposon-mediated *in situ* molecular breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 3037-3048.

K. Matsui, S. Yoshinami, M. Narita, M. F. Chien, L. Phung, S. Silver, and G. Endo. 2016. Mercury resistance transposons in Bacilli strains from different geographical regions. *FEMS Microbiology Letters* 363: fnw013.

〔学会発表〕（計 3 件）

K. Matsui and G. Endo. Real-time PCR assay for evaluating the distribution of mercury-resistant Bacilli in environmental soils. ASM Microbe 2018, 2018.

松井一彰、鈴木孝司、簡梅芳、遠藤銀朗「水銀 Bacilli の分布および存在量の把握に向けた定量 PCR 法の検討」環境微生物系学会合同大会 2017、仙台

K. Matsui, S. Yoshinami, M. Narita, M-F. Chien, LT. Phung, S. Silver and G. Endo. Dissemination of mercury resistance transposons among Bacilli across geographical barriers. 16th International Symposium on Microbial Ecology, 2016.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.matsui-lab.org/index.html>

6 . 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Simon Silver

ローマ字氏名：(SILVER, simon)

研究協力者氏名：遠藤 銀朗

ローマ字氏名：(ENDO ginro)