

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19841

研究課題名（和文）ゲノムと培地情報から探る未培養環境微生物の培養化戦略

研究課題名（英文）Culturing strategies for uncultivated environmental microorganisms based on genome and medium information

研究代表者

高見 英人（Takami, Hideto）

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：70359165

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、再構築された未培養菌ゲノムから予測された生理代謝能と類似する既知微生物群の培地情報をリンクさせ、論理的な未培養菌の培養化を目的とした。まず、未培養菌と類似する微生物群の培地成分を見やすく表示するデータベースを構築し、培養化する未培養菌は、これまでに1例しか報告のない嫌気性マンガン酸化菌とした。秋田県の八九郎温泉から採取したマンガン酸化物を含む堆積物からDNAを抽出し、メタゲノム解析を行った。再構築されたゲノム情報から生理代謝能を予測した。それと類似する既知微生物の培地情報に基づきマンガン堆積物を種菌として培養を開始し、培地条件の再検討を繰り返すことで、培養化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の微生物の分離培養は、過去の知見と経験則によるもので、対象となる微生物の生理代謝情報に基づいたものではない。これは、対象となる微生物の生理代謝機能を知る術がなかったからである。しかし、現在では、最新のメタゲノム解析技術によって未培養菌のゲノム情報が容易に得られ、生理代謝機能の予測も可能となってきた。

本研究では、未培養菌と既知微生物のゲノム情報から予測される生理代謝ポテンシャルを比較し、最も機能的類似性の高い微生物群の培地情報を利用することで、論理的に未培養菌が培養化できることを示した。本成果は、微生物の新たな可能性を見出し、学術並びに微生物産業へ大きく貢献する点で非常に意義深い。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to cultivate uncultivated bacteria logically by linking the physiological metabolic potential predicted from the reconstructed genome of uncultivated bacteria with the medium information of similar known microorganisms. First, we constructed a database that displays the medium components of microorganisms similar to uncultured bacteria in an easy-to-understand manner. DNA was extracted from sediments containing manganese oxide collected from Hachikuro hot spring in Akita Prefecture, and metagenomic analysis was performed. Physiological metabolic potential was predicted from the reconstructed genome information. Cultivation was started using the manganese deposit as an inoculum based on the medium information of known microorganisms similar to it. By repeatedly reexamining the medium conditions, we succeeded in culturing anaerobic manganese-oxidizing bacteria.

研究分野：微生物学、バイオインフォマティクス

キーワード：未培養菌の培養化 メタゲノム 再構築ゲノム 嫌気的マンガン酸化菌 生理代謝ポテンシャル Genome 培地データベース

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

微生物は、ヒト腸内から極限環境に至るあらゆる環境に生息し、16S rDNA 配列に基づく解析などからその計り知れない多様性が示唆されている。これら微生物の生き様を知る最も有効な手段の一つが培養であるが、その技術的な難しさから実際に我々が手にした培養微生物は、現存する微生物のわずかに 1%、多くても 10%程度と考えられている。培養化が難しい理由は多々あると考えられるが、その最も大きな理由の対象とする微生物の生理・代謝機能を知ることができないからである。一方、ゲノム配列解析技術の革新的進歩により、培養を介さず環境中のメタゲノムから優占種のゲノム再構築が可能となり、未知微生物のゲノム情報も安価に入手できる時代となった。そこで、未培養菌のゲノムからその生き様を探るべく、ゲノムから生理・代謝機能の評価を可能とした Genomable™ システムを分担研究者の五斗の協力を得て開発した^{1,2)}。これにより、培養化されたアーキア(古細菌)のゲノム情報を Genomable™ に供試し、その結果をクラスタリング解析することで、アーキアの機能分類が可能であることを示した³⁾。引き続き、培養を介さずゲノム再構築に成功した新規アーキアの生理代謝機能の評価し、状況証拠から独立栄養型と考えられていた本菌が従属栄養型である可能性が高いことを示した³⁾。

既知微生物の多くは、国内外の菌株保存機関に寄託されその培養条件が公開されている。しかし、記載様式が菌株保存機関によって異なることに加え、微生物の系統分類に沿った体系化された表記ではないため利便性が悪い。そこで、分担者の五斗は、未培養菌の培養化戦略の一貫として、既知微生物の培養に用いられる培地と物理化学的条件(培養条件)のデータベース化に取り組み始めた。これらの研究背景のもとに、既知微生物のゲノムから推測される生理・代謝機能と培養条件の関係を体系化して理解することができれば、未培養菌のゲノム情報から適切な培養条件を導き培養化が可能になるのではないかと考えたことが本研究の経緯である。

2. 研究の目的

培養を介さず微生物生態系のゲノムを網羅的に解析するメタゲノム解析技術の飛躍的な進歩によって、海洋の有機物や生元素循環を担う主要な微生物種、いわゆる鍵種が存在が近年次々と明らかになってきた。また、海洋表層に含まれる微生物の多糖類分解酵素によって低分子化された藻類由来の糖類が雲核の形成に影響を及ぼすとの知見もある。従って、これら鍵種の機能と動態の解明は、大気と海洋の諸現象の理解や地球温暖化に伴う豪雨災害を含めた異常気象などの環境変化予測にもつながる。

一方、生命史における初期地球環境に目を向けると、初期地球の海洋には鉄や環境中の動態が類似するマンガンが豊富に溶存していた。したがって、初期地球には、水素や硫黄以外にも鉄やマンガンを電子供与体として用いる化学合成細菌も存在したとする説が提唱されている^{4,5)}。実際、鉄酸化細菌と思われる微化石の発見や鉄・マンガン鉱床の年代分布などの地質学的知見、嫌気環境における非生物学的なマンガン酸化反応は起こり得ないとする鉱物学・熱力学的知見からも本説が強く支持されている⁶⁾。もし、本説が正しいとすれば、現地球の Mn(II)が豊富に存在する嫌気環境にも初期地球環境に生息した嫌気性マンガン酸化菌の子孫が現存すると期待される。したがって、海洋の有機物や生元素循環を担う鍵種や初期地球環境での微生物に関する新たな見識を得るには、分離培養が難しいとはいえ、培養化は避けられない重要な課題である。

ゲノム配列解析の技術革新に伴い、ゲノム解読が終了した細菌は 10,000 種を優に超え、メタゲノム解析手法により解読された未培養菌の未完成ゲノムも含めるとその数は数十万に達している。また、ゲノム情報から細菌の生理代謝機能の評価する Genomable™ システムも開発され、ゲノム情報から細菌の生き様を予測することが可能となってきた。したがって、ゲノム情報から予測される生理代謝機能と培養条件を論理的に結びつけることができれば、これまで未培養だった生物種の培養化に大きく貢献できると期待される。そこで本研究では、メタゲノム配列から完成度高く再構築されたゲノム情報を基に予測された生理代謝機能が最も類似する既知微生物の生理・代謝機能と培養条件との関係性から未培養菌の適切な培養条件を設定し培養化へ結びつけるためのデータベースの整備、方法論の開発とそれに基づく培養化を目的とした。

3. 研究の方法

3-1. Genomable の結果に基づくクラスタリングシステムと TOGO Medium との連携

Genomable は、登録された 3480 の原核生物種の機能ポテンシャル(分解、合成、輸送等)を機能モジュール単位の充足率(MCR)として数値化するシステムである。Genomable では、ゲノム配列から個別生物、メタゲノム配列から微生物群集が持つ生理代謝機能ポテンシャルとそのアバンダンスの評価が可能であるが、個別微生物間の生理代謝能比較には MCR 値のみを用いる。この結果を R 統計パッケージのクラスタリング関数を用いて簡便に表示するクラスタリングプログラムは既に開発済みである。しかし、Genomable に未登録の新規ゲノムのデータを取り込むことができないため、未登録データを取り込み、登録データと共にクラスタリングを可能とするプログラムへと改良を行った。一方、統合データベースセンターでは、国内の菌株保存機関に登録された微生物の培地や培養条件をデータベース化(TOGO Medium)しているが、ゲノム情報が公開されている菌株の多くはドイツの DSMZ や米国の ATCC などに登録されたもので、国内の菌株保存機関保有菌株との対応づけが必ずしもできていない。培地情報は菌株ごとに登録されているため、ゲノム既知の菌株と同種であっても菌株が異なると培地情報が表示されない。そこで、ゲノム既知の培地情報を広く活用するため、菌株単位に付された ID では

なく、種単位で付された ID を利用することで、同一菌株でなくてもゲノム既知の培地情報が利用できるようにデータベースの改良を行った。

上記で改良したクラスタリングプログラムには、ターゲットとする機能モジュールを充足する(充足率(MCR)が 100%)の生物種のみを選択する機能がある。したがって、未培養菌を特徴付けると考えられる機能モジュールの MCR を基に生物を簡単に選択してクラスタリング解析が可能である。これにより同一あるいは近傍のクラスター内の既知種の培地情報から候補培地を作製することになるが、このプログラムと TOGO Medium 間にリンクがないため、手作業で培地成分を整理、集約する必要がある。そこで、クラスタリング時に選択した既知生物種の培地情報を TOGO Medium から自動的に抽出し、描画するシステムへと改良を行った。

3-2. Metagenome 配列からのゲノム再構築と生理代謝機能の予測

実際に本課題で開発した方法論とシステムを用いて培養化する細菌のターゲットとして、海洋表層の微生物群集と鉄、マンガンが豊富な秋田県の八九郎温泉の堆積物中の微生物群集のメタゲノム配列から再構築したゲノム(MAG)配列に着目した。MAG の構築には、国立遺伝学研究所から提供されているメタゲノムアセンブルパイプライン(MetaWRAP⁷⁾)を用いて行った。本パイプラインで 90%以上の完成度となった MAG 配列を遺伝子アノテーションパイプライン D-fast に供試し、遺伝子領域予測と予備アノテーションを行った。これに続き、MAG の完成度を ribosome タンパク質の出現頻度から検証し MAG 配列からの生理代謝機能予測を行うため、予測された遺伝子のアミノ酸配列の multi-FASTA ファイルを Genomable システムに共試した(<http://maple.jamstec.go.jp/maple/maple-2.4.0/>)。

3-3. 未培養菌の培養条件の選択

メタゲノムアセンブルパイプラインの性質上、ゲノム中に複数コピー存在する遺伝子は再構築ゲノムに取り込まれにくい。16S rRNA 遺伝子に基づく種推定ができない場合がほとんどである。したがって、パイプラインから示唆された生物情報及び D-fast による機能アノテーションに付随した各遺伝子の生物種情報から MAG の系統分類群を推定した。これとは別に、Genomable から得られた各機能モジュールの充足率から特徴的と思われるモジュールを持つ生物種を 3-1 で改良したクラスタリングプログラムを用いて選択した。本課題では、海洋表層由来の MAG では多糖分解酵素の多様性が高い Verrucomicrobia 門の細菌とマンガン堆積物由来の MAG では、マンガン酸化能と独立栄養的生理代謝能を持つ細菌に着目した。これらの特徴を持つ MAG と系統的、機能的に類似する既知種の MCR パターンを基にクラスタリングを行い、MAG を含むクラスター内に属する既知生物の培地情報をリンク先の TOGO Medium から取得した。各既知種に共通な培地成分と特異的な培地成分をまとめ、培養化へ向けた候補培地を作製した。既知種の分離源などの情報は、論文から個別に取得した。

3-4. 嫌気性マンガン酸化菌の培養

3-3.で作製した候補培地を窒素ガスで置換したグローブボックス内で作製した。電子供与体となる 2 価マンガンは、炭酸マンガンまたは塩化マンガンを用い、電子受容体は、熱力学的に可能なクエン酸鉄または硝酸を用いた。硝酸は、硝酸ナトリウムまたは硝酸カリウムを別々に用い、これらの培地成分を組み合わせて複数の候補培地を作製した。その他の培地成分は、クラスタリングの結果、MAG 生物種と類似する既知種の培地成分の共通項を選択した。培地を加えた嫌気培養用ボトルに培養担体となる棒状に丸めた不織布を入れ、乳鉢ですり潰した秋田県八九郎温泉から採取した酸化マンガンを含む堆積物粉末を加えブチルゴム栓で密栓した。培養は、温泉の温度と同じ 42 度で行った。培養経過は日々観察し、マンガン酸化の指標となる黒色の沈殿物が形成されるまで培養を継続した。培地に入れた不織布の黒色化や黒色の沈殿物が確認された場合は、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡などで観察を行った。

4. 研究成果

4-1. Genomable の結果に基づくクラスタリングシステムと TOGO Medium との連携

Genomable に登録された既知生物種の MCR に基づくクラスタリングプログラムでは、新規

に Genomable 解析された個別ゲノムの結果を取り込むことができない。そこで、新たにこのプログラムに Genomable からダウンロードした結果のエクセルファイルを web 画面上からアップロードできるように改良した(図 1)。次に新規ゲノムと MCR パターンが類似する既知ゲノムとのクラスタリングにより、新規ゲノムと共にクラスターを形成する既知種の培地情報を生物種 ID を基に TOGO Medium から自動的に抽出、描画するシステムを構築した。次に、クラスタリング結果の表示画面上に TOGO Medium とリンクさせるためのラジオボタンを設置し(図 2)、クラスタリングに使われた既知生物種の培地情報を表示する web インターフェースを構築した(図 3)。



図1. 新規機能(excel fileの取り込み)が追加されたMCRパターンに基づくクラスタリングプログラム

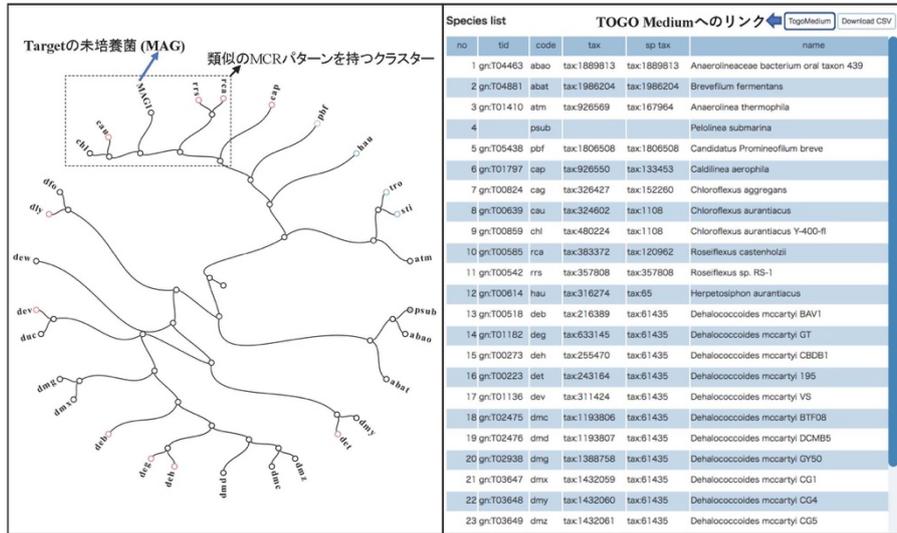


図2. 未培養菌を含む既知生物種とのMCRパターンによるクラスタリングと選択生物種のTOGO Mediumへのリンク

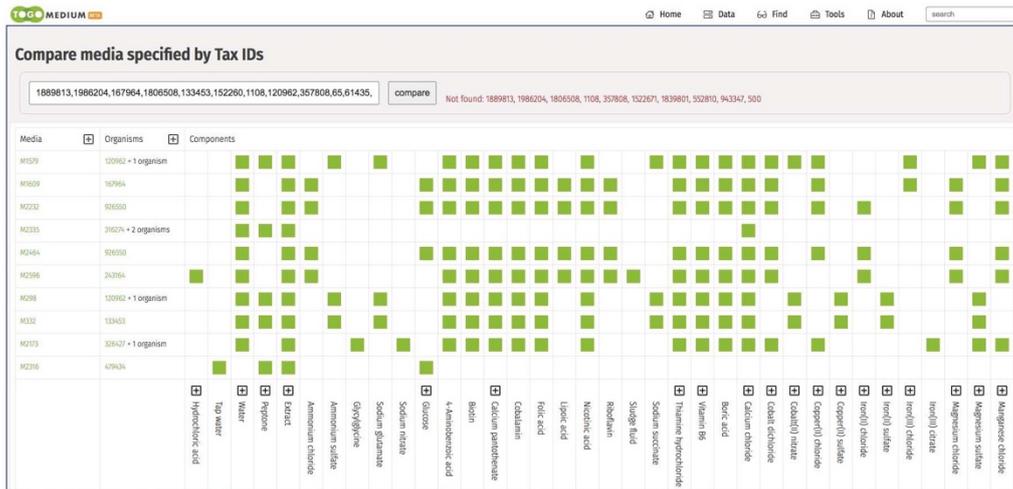


図3. クラスタリングプログラムと連携したTOGO Medium

4-2. Metagenome 配列からのゲノム再構築と生理代謝機能の予測

海洋表層の微生物群集のメタゲノム配列からターゲットとした Verrucomicrobia 門由来と思われる数個の MAG が再構築された。しかし、その完成度はいずれも 90%を下回っていたため、Genomagle を用いた生理代謝能評価の対象にならなかった。一方、八九郎温泉で採取した堆積物のメタゲノム配列からも複数の MAG が再構築され、その中からターゲットとするマンガン酸化酵素を持つ完成度が 90%以上の MAG を見いだすことができた。そこで、本 MAG 中に予測された全遺伝子のアミノ酸配列の multi-FASTA ファイルを Genomagle に供試したところ、独立栄養性を示唆する還元型 Acetyl-CoA パスウェイ(CO₂固定)や複数のアミノ酸やビタミン合成能を有することが分かった。また、好熱性細菌に特有な fructose-1,6 biphosphate aldolase/phosphatase に加え、硫酸還元能も見出された。一方、本 MAG にはやはり 16S rRNA 遺伝子が含まれていなかったため、最も類似する種の予測はできなかった。しかし、MetaWARP パイプラインにより Nitrospirota 門の分類群に属すると予測されたため、Genomagle に登録された Nitrospirota 門の 10 菌株に加え、Acetyl-CoA パスウェイによる CO₂ 固定能と硫酸還元能を合せ持つ生物種を選択し、MAG 生物種と共にクラスタリングを行った。その結果、MAG 生物種は、Nitrospirota 門の *Thermodesulfobrio yellowstonii* と生理代謝能が類似していることがわかった。なお MAG 生物種は、他の 5 種と共に大きなクラスターを形成した(図 4)。

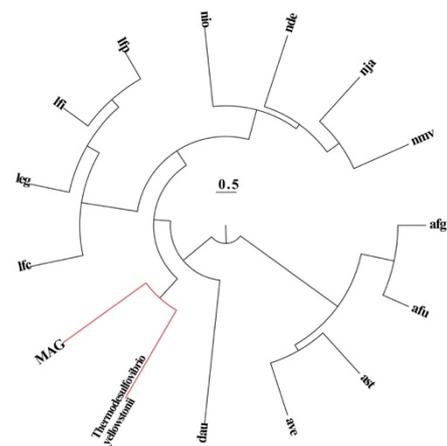


図4. MCRパターンに基づくMAGと既知種とのクラスタリング

4-3. 未培養菌の培養条件の選択

MAG 生物種と最も類似した *T. yellowstonii* と他の 5 種の培地成分をこの結果とリンクした TOGO Medium の培地データベースから取得した。*T. yellowstonii* の培地成分は、有機物が含まれていたが、MAG 生物種は、独立栄養性と考えられるので、*T. yellowstonii* の培地から有機物を除き、他の 5 種で

使われている、微量元素ミックスやビタミンミックスを作製した。これに加えリン酸塩や硫酸還元剤の基質となる硫酸塩を加えた培地を 3-3 で示した電子供与体と受容体の組み合わせ培地成分を加えたものを基本候補培地として培養を行った。

4-4. 嫌気性マンガン酸化菌の培養化

4-3 で作製した培地に 3-4 で準備した堆積物粉末を嫌気グローブボックス内で加え、42 度で培養を開始した。培養後 3 週間経過した時点で電子供与体に MnCO_3 または MnCl_2 、電子受容体にクエン酸鉄を用いた培地の不織布が黒色化した(図 5)。さらに 2 週間後には、電子受容体に硝酸カリウムを用いた培地で色が薄いながらも黒色化が確認された。そこで、黒色化した不織布から掻き取った黒色固形物や培地中の黒色沈殿物を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で確認した。サンプル回収時にブチルゴム栓を開けると強い硫化水素臭がし、培地成分として添加した硫酸塩が還元され硫化水素が発生したことがわかった。MAG 生物種には硫酸還元能があると示唆されているので、予想通りの結果と言えるが、光学顕微鏡下の観察において、複数の形態の菌が観察されているため、他の硫酸還元菌により可能性も否定できない。光学顕微鏡では、約 $1\mu\text{m}$ の球菌に加え、単桿菌や螺旋状の菌など少なくとも 5 種類程度が観察された。電子顕微鏡の観察では、約 $5\mu\text{m}$ の球状をした MnCO_3 上に約 $1\mu\text{m}$ の球状の細菌が観察され(図 6)、エネルギー分散型 X 線分光法(EDS)による元素分析の結果、球菌の表層にはマンガンが検出された。この結果からターゲットとする嫌気性マンガン酸化菌は約 $1\mu\text{m}$ の球状の細菌であると考えられた。この細菌表層のマンガン酸化物をさらに透過型電子顕微鏡(FIB-TEM)、電子エネルギー損出分光法(EELS)で観察したところ、細胞の場所によって 3 価、4 価、2 価と 3 価の酸化マンガン混合物であることが確認された。また、電子受容体として加えたクエン酸鉄(3 価)の挙動を同仁化学の *o*-Phenanthroline を用いて調べたところ、培養液が黒色化を始める 2 週間後半から急激に 2 価鉄の濃度上昇が見られた。この結果は、培養化されたマンガン酸化菌が 2 価マンガンを嫌気的に 3 価、あるいは 4 価に酸化し、生じた電子を 3 価の鉄に受け渡し還元することで、エネルギーを獲得していると考えられる。このように、本課題において、未培養菌の MAG 配列から予想される生理代謝機能と類似する既知微生物の培地情報を利用することで、未培養の嫌気性マンガン酸化菌の培養化に成功した。

しかしながら、本研究期間内では純粋培養までには至っておらず、今後さらなる培地の検討や抗生物質などの利用も含め、純粋培養へ向けた検討が必要である。また、集積度を向上させた培養液のメタゲノム配列から DNA を抽出し、ショットガンライブラリーに加え、長鎖の断片が挿入されたフォスミドライブラリーなどを利用することでマンガン酸化菌の完成ゲノムを構築することで、より詳細な系統関係、生理代謝機能の解明につながると期待される。



図5. 嫌気的マンガン酸化菌集積培養。不織布に黒色化したマンガン酸化物が形成

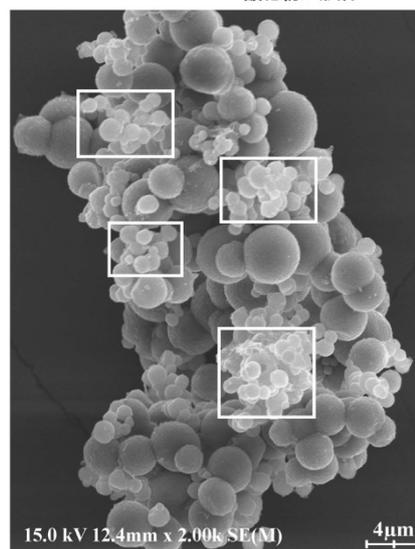


図6. 培養化に成功したマンガン酸化細菌
大きな球状物質は、 MnCO_3 (電子供与体)
白枠： MnCO_3 上に生育したマンガン酸化球菌

<引用文献>

- 1) Takami H. et al. (2016) An automated system for evaluation of the potential functionome: MAPLE version 2.1.0. *DNA Res.* 23, 467-475.
- 2) Arai, W., et al. (2018) MAPLE 2.3.0: An improved system for evaluating the functionomes of genomes and metagenomes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 82,1515-1517.
- 3) Takami, H., et al. (2015) Functional classification of uncultured “Candidatus Caldiarchaeum subterraneum” using the MAPLE system. *PLoS ONE* 10, e0132994.
- 4) Lyons, T.W., et al. (2020) Shedding light on manganese cycling in the early oceans. *PNAS* 117, 25960-25962.
- 5) Martin, W., et al., (2008) Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 805-814.
- 6) Tebo, B.M., et al (2004) Biogenic manganese oxide: Properties and mechanisms of formation. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 32, 287-328.
- 7) Uritskiy, G.V., et al. (2018) MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 6, 58.

<謝辞>

本研究で開発した未培養微生物の培養化法の有効性を嫌気性マンガン酸化菌の培養によって示すことができたが、マンガン酸化菌の培養にあたって、サンプルの提供や実験、ディスカッションに多大な貢献をいただいた研究協力者の東京大学大気海洋研究所(現日本学術振興会 特別研究員:理化学研究所)の塚本雄也博士に深謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahi Okubo, Hideto Takami	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolic potential of the imperfect denitrifier Candidatus Desulfobacillus denitrificans in an anammox bioreactor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.1227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ola Alessa, Yoshitoshi Ogura, Yoshiko Fujitani, Hideto Takami, Tetsuya Hayashi, Nurettin Sahin, Akio Tani	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive Comparative Genomics and Phenotyping of Methylobacterium Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.74061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本雄也、高見英人、吉澤晋
2. 発表標題 再構築ゲノム情報に基づく貧酸素環境下で独立栄養なマンガン酸化細菌の培養化
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会 年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	五斗 進 (Goto Susumu) (40263149)	大学共同利用機関法人情報・システム研究機構（機構本部施設等）・データサイエンス共同利用基盤施設・教授 (82657)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	塚本 雄也 (Tsukamoto Yuya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関