

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14595

研究課題名（和文）遺伝子の水平伝播ワールドにおける細菌分類の指標探索

研究課題名（英文）Indicator search for bacterial taxon in the horizontal gene transfer world

研究代表者

馬場 知哉（BABA, Tomoya）

国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進センター・特任教員

研究者番号：00338196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：南極湖沼の生態系から分離された細菌のゲノム解析から、他の大陸の近縁種と比較して、南極細菌は遺伝子の水平伝播を多用し、遺伝子の水平伝播ワールドを形成する特殊な進化が示唆された。これら南極細菌のゲノム情報から、生命情報学的手法により、細菌分類の指標探索を試みた。水平伝播遺伝子の推定方法として、連続塩基組成から配列断片を生物種ごとに高精度にクラスタリングする一括学習型自己組織化マップ（BLSOM）に基づいた推定を適用した。その結果、菌株によって水平伝播遺伝子の由来は大きく異なるにも関わらず、水平伝播される遺伝子群の機能には共通性が示唆されるなど、新たな分類指標の基盤となる知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

南極大陸は約1億5千万年前のジュラ紀頃まで、他の大陸と超巨大大陸パンゲアの一部を形成し、温暖な気候であった。大陸移動により南下・寒冷化し、現在のような極寒の大陸へと変容していく過程において、南極大陸上の生物圏は、その気候変動に伴い極限環境（低温・凍結、貧栄養、強力な紫外線照射など）に適応進化し、湖沼に生息する生物（細菌など）のゲノム上には、遺伝子の水平伝播（異なる生物種間での遺伝子のやりとり）として、その痕跡が残された。これを生命情報学的手法により、定性的かつ定量的に評価することで、地球上における生物多様性の原動力の一端が、南極にも存在したことを明らかにした点に意義がある。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that there are existing horizontal gene transfer (HGT) world in the Antarctic lake environments where bacteria had obtained so much genes from other bacteria by their genome analyses. We tried to search some new indicators for bacterial taxon in the HGT world by using bioinformatics of comparative genomics. Our approach is the application of Batch-Learning Self-Organizing Map, BLSOM, that enable each DNA sequence fragments to be clustered with a high degree of accuracy on species of each organism. Our BLSOM analysis suggested that depending on bacterial strains they had obtained genes by HGT from different taxon, however, those gene has common functions. It would be new findings to be start-points of the indicators for bacterial taxon in the HGT world.

研究分野：ゲノム分類学

キーワード：南極 細菌 ゲノム 水平伝播 生命情報解析 分類 環境適応 進化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌の分類は遺伝型 (16S rRNA などの系統関係・DNA-DNA ハイブリダイゼーション) および表現型 (形態・資化能・生化学的諸性質) により体系化されてきたが、近年急速に蓄積が進むゲノム情報の活用が課題とされ(引用文献)、細菌と古細菌の全標準株 (約 11,000 株) について国際協力によるゲノム解読が始まり、ゲノム情報を基にした分類の体系化が急がれている(引用文献)。南極大陸は約 1 億 5 千万年前のジュラ紀頃には、他の大陸と共に超巨大大陸パンゲアの一部を形成し、温暖な気候であったが、大陸移動により南下・寒冷化し、現在の極寒の大陸へと変容したと考えられている(引用文献)。南極大陸上の生物圏は、その気候変動に伴い極限環境 (低温・凍結、貧栄養、強力な紫外線照射など) に適応進化したと考えられ、日本の南極観測隊が発見した南極大陸東部の湖沼底に生息する“コケ坊主”と呼ばれる水棲化したコケの生物圏はその一例でもある(引用文献)。コケ坊主生物圏を構成する細菌 12 種 (α -プロテオバクテリア 6 種、 β -プロテオバクテリア 2 種、 γ -プロテオバクテリア 1 種、バクテロイデテス 1 種、アクチノバクテリア 2 種) のゲノム配列情報 (3.2~6.6 Mb) から、他の大陸起源の近縁種と比較して、水平伝播が推定された遺伝子が多く (ゲノム上の遺伝子の 17~31% が目(Order)以上の遠縁種間での水平伝播、これに対してデータベース上の細菌の全ゲノム情報での平均は 14%、最大で 24%)、南極湖沼のコケ坊主生物圏の細菌では、遺伝子の水平伝播を多用した水平伝播ワールドである可能性が示唆された。近縁種の特定は他の大陸起源の標準株の 16S rRNA 配列を指標としたが、ゲノム比較からは一部で矛盾が示唆され、例えば、16S rRNA の系統関係からは α -プロテオバクテリアの *Rhizobium* 属 (98%一致) と推定された南極細菌はゲノム比較 (ゲノム上の遺伝子の構成) からは *Sinorhizobium* 属であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

生物の進化と分類の体系化は基礎生物学の根幹であり、南極大陸上の湖沼生物圏を構成する細菌のゲノム解析の結果、遺伝子の水平伝播ワールドと言えるほど多くの遺伝子での水平伝播が示唆され、16S rRNA など一部の遺伝子配列を基にした系統解析では正確な分類は困難であることが明らかとなった。本研究はゲノム情報を網羅的な遺伝型として、それを生命情報解析の手法により南極細菌の特殊な進化と分類に関する新たな指標の探索を目的とした。

3. 研究の方法

南極細菌の特殊な進化と分類に関する新たな指標の探索のために、必須条件となる高精度のゲノム配列情報を、コケ坊主生物圏を構成する細菌 12 種 (α -プロテオバクテリア 6 種、 β -プロテオバクテリア 2 種、 γ -プロテオバクテリア 1 種、バクテロイデテス 1 種、アクチノバクテリア 2 種) のゲノム配列 (3.2~6.6 Mb) の全てに対して取り組んだ。ゲノム上に特殊な繰り返し配列等の塩基配列情報の取得が困難な領域が複数存在したため、 α -プロテオバクテリアに属する *Sphingomonas* 属細菌 2 株について、集中的に解析する事とした。次に、南極分離株と他の大陸で分離されゲノム解析情報も得られている近縁種との間での詳細な比較ゲノム解析を試みた。データベース上にある既知の機能性遺伝子のアミノ酸配列の類似性に基づく BLASTP 解析では、データベース上の遺伝子と有意な類似性が認められない場合は判定不能となる。そこで、ゲノム上の水平伝播遺伝子の推定に新たな生命情報学的手法を活用し、BLASTP 解析で推定された水平伝播遺伝子の検証と、新規の水平伝播遺伝子の発見を試みた。水平伝播遺伝子の推定方法として、連続塩基組成のみに着目することで配列断片を生物種ごとの高精度なクラスタリングを可能にする一括学習型自己組織化マップ (Batch-Learning Self-Organizing Map, BLSOM) に基づいた手法を適用した (図 1)。本手法はゲノム配列を 5kb (5,000 塩基) ごとに断片化し、さらに断片化を 1kb (1,000 塩基) ずつスライドさせたゲノム断片配列を用意することで、ゲノム上の全ての 1kb の配列が 5 つの 5kb 断片配列に含まれ、これらの 5kb 断片配列を 2 段階の BLSOM により解析を行った。第 1 段階は原核生物の Phylum (門) レベルでの推定を行い、第 2 段階で Phylum ごとに Genus (属) レベルでの推定を行った。ここで、各段階での系統推定はゲノム断片配列が分類されたマップ上の格子点とその周囲 8 点に分類されていた最上位の生物系統とした。

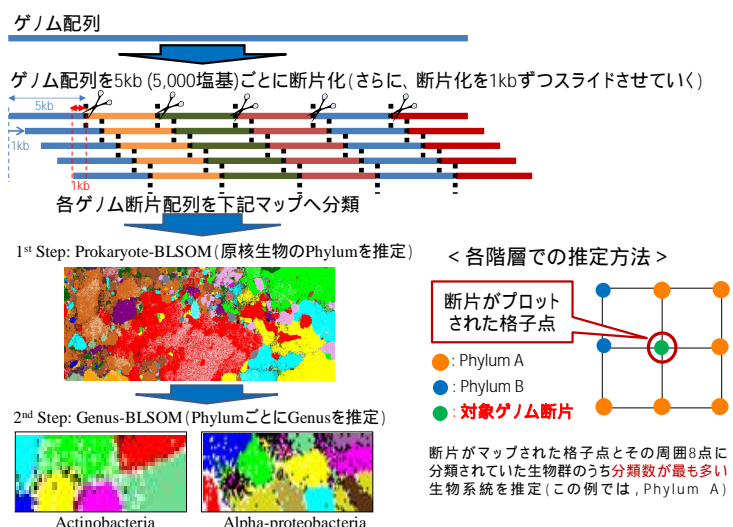


図 1 BLSOMによるゲノム上の遺伝子 (ゲノム配列断片) の生物系統の推定方法

4. 研究成果

BLSOM による推定結果の一例と既存の BLAST 解析との比較を図 2 に示す。南極コケ坊主から分離され、16S rRNA 配列による系統解析では *Sphingomonas* 属細菌と同定された HMP6 株と HMP9 株は、ゲノムサイズ、ゲノム GC%、ゲノム上の遺伝子数など、ゲノム組成は相互に似ていたが、遺伝子の塩基配列による解析(BLASTN)では、他の大陸上で分離された近縁種と Genus (属) レベルでの保存性が極めて低く (ゲノム上の全遺伝子の 50%以下)、Family (科)、Order (目) あるいは Phylum (門) レベルでの水平伝播遺伝子の存在が示唆され、40%以上の遺伝子は推定不能 (検出不能; Unknown) であった。遺伝子のアミノ酸配列による解析(BLASTP)では、65%程度の遺伝子で Genus レベルでの保存性が認められたが、25%以上の遺伝子は推定不能であった。BLSOM による推定の結果、これらの多くが Genus から Phylum の各レベルでの水平伝播遺伝子であることが示唆された。なお、BLSOM と BLASTP の結果の一致率は、Genus レベルで 57%、Phylum レベルでは 95%であった。一般に Genus レベルでの水平伝播遺伝子の推定は、種分化 (系統分岐) と遺伝子の水平伝播の時期の関係性を考慮する必要がある。例えば、Family レベル以前の分岐時期で水平伝播した遺伝子は、その後の Genus レベルでの分岐により現在の Genus レベルでの推定が困難になることが考えられ、その評価は今後の検討課題である。HMP6 株と HMP9 株の水平伝播が強く示唆された遺伝子群について、詳細な比較解析を行った結果、HMP6 株は主に同じ Phylum (門) レベルである α -プロテオバクテリアから多くの水平伝播遺伝子を獲得したのに対して、HMP9 株では異なる Phylum (門) レベルである β -プロテオバクテリアから多くの水平伝播遺伝子を獲得したことが示唆された。これらの水平伝播遺伝子群の機能の推定をしたところ、共通して細胞膜関連の遺伝子群が多いことが示唆された。南極の低温環境への適応に細胞膜の流動性に関与する遺伝子群を水平伝播により多く獲得した生存戦略の一環であったことが考えられたが、それに関する評価は今後の検討課題である。以上の結果から、南極の湖沼環境から分離された南極細菌の水平伝播遺伝子を中心に、南極細菌の特殊な進化と分類に関する新たな指標の探索を生命情報学的手法により試みた。いくつかの特徴的な性質、例えば、細胞膜関連の遺伝子群など、遺伝子機能の推定にも取り組み、今後の評価法に関する指針が得られた点で、萌芽研究としての意義があると考えられる。

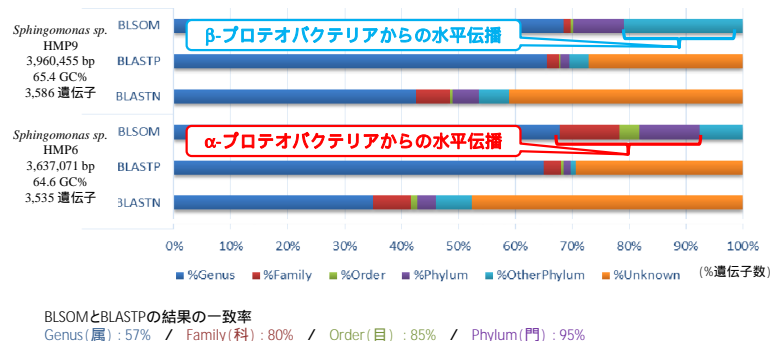


図2 BLSOMによるゲノム上の遺伝子の生物系統の推定結果とBLASTとの比較

遺伝子の生物系統の推定基準

- BLSOM: 各遺伝子がコードされているゲノム断片の塩基配列に対する推定結果
- BLASTP: 各遺伝子のアミノ酸配列に対してe値1e-5以下のトップヒットで、一致率70%以上、かつ、カバー率70%以上
- BLASTN: 各遺伝子の塩基配列に対してe値1e-5以下のトップヒット

< 引用文献 >

- Jones Amanda, The Future of Taxonomy. *Advances in Applied Microbiology*, **80**. 2012, 23-34
- Kyrpides N, *et al.*, Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea: Sequencing a Myriad of Type Strains. *PLoS Biology*, **12**. 2014. e1001920
- Eyles N, Glacio-epochs and the supercontinent cycle after ~ 3.0 Ga: Tectonic boundary conditions for glaciation. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*. **258**. 2008. 89-129
- Imura S, *et al.*, Benthic moss pillars in Antarctic lakes, *Polar Biol.*, **22**, 1999, 137-140

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Higashi K, Kawai Y, Baba T, Kurokawa K, Oshima T, Essential cellular modules for the proliferation of the primitive cell, *Geoscience Frontiers*, 査読有, **9**, 2018, 1155-1161 DOI: 10.1016/j.gsf.2016.11.013

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, *Stand. Genomic Sci.*, 査読有, 11, 2016, e00616-16
DOI: 10.1186/s40793-016-0210-6

Nakai R, Fujisawa T, Nakamura Y, Nishide H, Uchiyama I, Baba T, Toyoda A, Fujiyama A, Naganuma T, Niki H, Complete Genome Sequence of *Aurantimicrobium minutum* Type Strain KNC^T, a Planktonic Ultramicrobacterium Isolated from River Water, *Genome Announc.*, 査読有, 4, 2016, e00616-16
DOI: 10.1128/genomeA.00616-16

Nakai R, Baba T, Niki H, Nishijima M, Naganuma T, *Aurantimicrobium minutum* gen. nov., sp. nov., a novel ultramicrobacterium of the family *Microbacteriaceae*, isolated from river water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 査読有, 65, 2015, 4072-4079
DOI: 10.1099/ijsem.0.000541

[学会発表](計14件)

赤澤優、阿部貴志、仁木宏典、馬場知哉、南極コケ坊主由来 *Sphingomonas* 属細菌 2 種の環境適応に関する比較ゲノム解析、第 13 回日本ゲノム微生物学会年会、2019 年 3 月 8 日、首都大学東京南大沢キャンパス(東京都八王子市)

赤澤 優、阿部 貴志、仁木 宏典、馬場 知哉、遺伝子の水平伝播とアミノ酸組成変化に基づく南極細菌の種固有な低温適応戦略の解明、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区)

Yu Akazawa, Takashi Abe and Tomoya Baba, 一括学習型自己組織化マップ(BLSOM)による南極微生物からの水平伝播候補遺伝子検出、生命医薬情報学連合大会 2018、2018 年 9 月 20 日、荘銀タクト鶴岡(山形県鶴岡市)

赤澤 優、阿部 貴志、仁木 宏典、馬場 知哉、南極大陸から単離された細菌における種固有な低温適応戦略の解明、生命科学系学会合同年次大会(ConBio)2017、2017 年 12 月 8 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、長沼毅、藤山秋佐夫、神田啓史、本山秀明、伊村智、仁木宏典、南極湖沼における細菌ゲノムの構造特性、生命科学系学会合同大会(ConBio) 2017、2017 年 12 月 8 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

馬場知哉、阿部貴志、“遺伝子の水平伝播”とは何か?、生命科学系学会合同大会(ConBio) 2017、フォーラム、2017 年 12 月 6 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

赤澤優、阿部貴志、仁木宏典、馬場知哉、遺伝子の水平伝播とアミノ酸組成からみた微生物の南極環境への適応戦略の解明、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会、2017 年 3 月 3 日、慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、中井亮佑、長沼毅、藤山秋佐夫、神田啓史、本山秀明、伊村智、仁木宏典、南極にみる遺伝子の水平伝播ワールド、第 39 回日本分子生物学会年会、シンポジウム「遺伝情報の水平移動」【招待講演】、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松浦俊一、馬場知哉、千葉真奈美、角田達朗、山口有朋、シリカ系ナノ細孔を利用した 1 分子 DNA 増幅技術の開発、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松浦俊一、馬場知哉、千葉真奈美、角田 達朗、山口有朋、ナノ空間反応場を利用した 1 分子 DNA 増幅システムの構築、第 68 回日本生物工学会大会、【大会トピックス選出】、2016 年 9 月 30 日、富山国際会議場(富山県富山市)

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Environmental adaptation of polar bacteria; 'To be, or not to be frozen.', 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会、2016 年 3 月 4 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)

阿部貴志、中道真喜、吉田淳一郎、仁木宏典、馬場知哉、BLSOM 解析による微生物の南極環境への適応戦略の解明、第 10 回日本ゲノム微生物学会年会、2016 年 3 月 4 日、東京工業大学

大岡山キャンパス（東京都目黒区）

Baba T, Abe T, Toyoda A, Nakai R, Naganuma T, Fujiyama A, Imura S, Kanda K, Motoyama H, Niki H, Genomic Evolutions of Polar Bacteria, Interdisciplinary Session "Systematic Analysis for Global Environmental Change and Life on Earth", The Sixth Symposium on Polar Science, 2015年11月19日、国立極地研究所（東京都立川市）

馬場知哉、南極湖沼における遺伝子の水平伝播ワールド、日本進化学会第17回大会、ワークショップ「南極の陸上生物圏の適応進化」【招待講演】、2015年8月21日、中央大学後楽園キャンパス（東京都文京区）

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：阿部 貴志

ローマ字氏名：ABE, takashi

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、研究者個人に帰属されます。