

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 ( 共通 )

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号： 8 2 6 2 6

研究種目： 基盤研究(C) ( 一般 )

研究期間： 2017 ~ 2019

課題番号： 1 7 K 0 7 7 1 4

研究課題名 ( 和文 ) バイオフィームでの遺伝子水平伝播と生物進化

研究課題名 ( 英文 ) Horizontal gene transfer in biofilm and evolution

研究代表者

中島 信孝 ( Nakashima, Nobutaka )

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号： 7 0 3 5 7 6 2 2

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 3,700,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : つくば市の池の底からバイオフィーム試料を採取し、その試料を2つに分割した。その後、片方のみをDNaseで処理した。合計6試料からDNAを採取し、得られたDNA試料をHiSeqによるシーケンシングに供した。得られたシーケンシング結果は、MetaWRAPのパイプラインと同様に進めた。アセンブルとBinningの結果、メタゲノムをBinにまで処理することができた。DNase処理の有無で、abundanceが統計上有意に異なるBinがいくつか見つかった。それとは独立にBinningに依存しない遺伝子組成の変化について調べた所、DNaseの処理の有無で、統計上有意に異なる種の存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、微生物の多様性獲得のメカニズム、ゲノム進化の過程を解明するにあたって大変意義深いものである。そればかりではなく、バイオフィームの有効利用、人体や環境に悪影響を与えるバイオフィームの効果的除去のための基盤情報となる。なお、バイオフィーム内の微生物は抗生物質や各種化学物質、加熱に対して抵抗性を示し、現状ではその除去が困難である。

研究成果の概要 ( 英文 ) : Biofilm samples were obtained from the bottom of a pond in Tsukuba city, and the samples were divided into two. Only one sample was treated with DNase. Genomic DNA was purified from a total of 6 samples, and the obtained DNA samples were subjected to HiSeq sequencing. The sequencing results were manipulated according to the MetaWRAP pipeline. As a result of assembling and Binning, Bins were obtained as expected. Some Bins were found to have statistically significant abundances with and without DNase treatment. Also, we examined changes in gene composition that did not depend on Binning, and revealed the existence of statistically significantly different species with and without DNase treatment.

研究分野： 応用微生物学

キーワード： バイオフィーム 次世代シーケンサ

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。

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、食品の腐敗、医療器具(カテーテルなど)の汚染、人体組織表面(歯など)における疾病などを引き起こす。従って、バイオフィーム形成を調節する方法や、完全に除去する方法を開発する必要があるが、バイオフィームが形成される分子メカニズムに不明な点が多く、未だに実現困難である。

本申請者は、2013 年ころから、多種微生物からなるバイオフィームについて研究を開始した。その背景には、次世代シーケンサーによる配列解読が一般化し、複雑な微生物群集の解析が容易になったことがあった。その結果、幾つかの興味深い知見が得られたが、中でも特に重大なものが、バイオフィーム細胞群では浮遊細胞群と比較して、ストレス応答遺伝子が発現亢進し、DNA 修復遺伝子などが発現低下しているというものである。この結果は、微生物が環境ストレスに対応すべくバイオフィームを形成し、その内部で突然変異発生率を意図的に上昇させていることを示唆している。つまり、バイオフィーム内部が「適応進化のためのゆりかご」となっている可能性が浮上したのである(Nakamura et al., 2016, Appl Microbiol Biotechnol 100:7263-)。同様の結果が他のグループからも報告されつつあり(Steenackers et al., 2016, FEMS Microbiol Rev 40: 373-)。バイオフィームと生物進化の関わりに世界的な注目が集まりつつある。

一方で、バイオフィームと進化について他の興味深い説が唱えられている。それは、バイオフィーム内部が遺伝子の水平伝播の場になっているというものである。バイオフィームの構造体内部には、多量の細胞外 DNA (以下、extracellular DNA の略 eDNA と記載する) が存在していることが知られており、それが遺伝子水平伝播の原材料になっている可能性がある。バイオフィーム内部は浮遊状態と比較して、高密度に微生物細胞が密集した状態であるので、遺伝子の水平伝播を起こすために大変有利な場所であると考えられる。以上、バイオフィームでの突然変異の発生率上昇と遺伝子水平伝播の発生の可能性を鑑みると、バイオフィームは、地球上で原始的な微生物が誕生した後、進化の過程で大変重要な構造体であった可能性が示唆される。実際に、バイオフィームは、原始地球が生物にとって過酷な環境だった頃から存在していると考えられており、微生物がそこを生き抜くため、また、進化するために重要だったと指摘する研究者も多い(Stoodley et al., 2004, Nat Rev Microbiol 2, 95-)。

これまでに、eDNA が、バイオフィーム構造の形成、バイオフィーム形成量などに与える役割を調べた論文は多数存在する。しかし、多種微生物からなるバイオフィームの eDNA が、どのような組成の DNA でどこから由来してきたものなのか、あるいは、実際に水平伝播に利用されているものなのか、についての知見はほとんど存在しない。そこで、本申請の研究では、バイオフィーム内部に存在する eDNA について、以下のように研究を実施する。

## 2. 研究の目的

本申請の研究では、バイオフィーム内部に存在する eDNA について、以下のように研究を実施する。(i)環境中のバイオフィームから eDNA を取得し、次世代シーケンサーによって 16S rDNA 配列を大量に配列解読する。これによって、eDNA の由来する微生物を特定することができる。(ii)(i)と同じ試料から、細胞内 DNA (以下、intracellular DNA の略 iDNA と記載する) を取得し、16S rDNA 配列の大量解読を行う。(i)の結果と比較することで、eDNA が現在バイオフィームを構成している微生物から漏出したものなのか、それとも、バイオフィーム形成のために犠牲になった過去の微生物に由来するものなのか判明する。もし後者であれば、過去に当該バイオフィーム近傍に居たであろうが、現在は居なくなった微生物を、あたかもタイムマシンに乗って見てきたかのように知ることができる。本申請者は後者の結果を予想している。(iii)(i)と同じ試料から、eDNA、iDNA のメタゲノム配列を大量に配列解読する。これによって、eDNA の遺伝子組成が iDNA のそれに対して偏りがあるかどうか判明する。また、偏りのある遺伝子がどのようなタンパク質をコードしているかを調べる。特に、薬剤耐性遺伝子や病原性を司る遺伝子が、iDNA より eDNA に多く存在していないか注意深く確認する。本申請者は、これら遺伝子の存在量が eDNA では多いのではないかと予想している。(iv)(iii)において、大量の eDNA、iDNA の配列から、ある程度ゲノム配列が決定される微生物が出ると予想される。これらのゲノム配列を用いて、局所的 GC 含量の比較、既知ゲノムとの比較などの方法によって、水平伝播によって iDNA ゲノム中に存在するようになったと考えられる遺伝子が判明すると考える。よって、そのような遺伝子が、eDNA ゲノム中では水平伝播ではなく、天然に存在していたことを示す。さらに、そのような遺伝子の eDNA での存在量を確認する。

以上によって、多種微生物からなるバイオフィームと遺伝子水平伝播および病原性の関係性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

バイオフィームのサンプルは東京近郊の河川の石の表面、池、水道排水口などから採取する。バイオフィームの空間配置を知るため、採取時の天地を明確にしておく。サンプルは、河川の上流と下流、池の浅いと深い場所、など環境の異なる複数の場所から採取する。採取の際、バイオフィーム直近の水の pH と温度を測定する。

採取したバイオフィームサンプルを垂直方向に、表面部分、準深層部分(準中心部分)、深層部分(中心部分)などに適宜分割する。次いで、各部分を水平方向に二分割にする。分割した一

方からは eDNA を、もう一方からは iDNA を分離する。iDNA は、過去の知見から「PowerSoil」や「Power Biofilm」など商用の環境ゲノム DNA 精製キットによって精製可能であることが明らかであるので、キットの説明書に従って精製を行う。

eDNA の精製については世界的に見てもノウハウが非常に少なく、試行錯誤が必要であろう。例として、バイオフィルムを生理食塩水で洗浄する、セルラーゼやプロテアーゼ(共にヌクレアーゼフリーグレードのもの)によってバイオフィルムを化学的に分解する、細胞が破壊されない程度の撹拌でバイオフィルムを物理的に分解する、などの処置が考えられる。2009 年、Wu らは単一細菌種によって形成されたバイオフィルムの eDNA について、何種類かの精製方法を試験した結果を報告している (Wu et al., 2009, Appl Environ Microbiol 75:5390-)。この報告も参考にしながら、酵素的方法や物理的方法など、iDNA が混入しない精製方法を検討していく。そして、それらによって得られた上澄み液から「PowerSoil」キット、あるいは単純なフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出 - エタノール沈殿によって DNA を精製する。確実に細胞外の DNA であることを示すために、得られた上澄み液を DNaseI によって処理したのももネガティブコントロールとして準備する。

もし、細胞内と細胞外の DNA の分離が困難なようであれば、採取したばかりのバイオフィルムを、過剰量の DNaseI によって処理したものとしなかったものを並行して作成し、両者から全 DNA を抽出・精製する。そして、両者の解析結果を比較して、その差分から細胞内外の DNA を判別する方法も考慮する。

上述のように精製した細胞内外の DNA を鋳型として、16S rDNA 配列を PCR によって増幅する。用いるプライマー配列は、Mori らによって開発された真性細菌とアーキアの 16S rDNA を選択的に増幅するもの (Mori et al., 2014, DNA Res 21:217-)。イルミナ株式会社の推奨する V3 および V4 領域をターゲットとし 469 塩基対前後のアンプリコンを得るもの、2 種類を用いる。配列決定は、イルミナ株式会社の MiSeq シーケンサーによって行う。次いで、得られた配列情報を、MiSeq に付属の MiSeq Reporter ソフトウェアなどによって解析し、属レベルでの系統分類を行う。

#### 4. 研究成果

東京都内や北海道内など、様々な場所でのバイオフィルムサンプルの取得可能性を検討した。その結果、様々な環境からバイオフィルム試料を取得することに成功した。しかし、予定よりも得られるバイオフィルムの体積が少ない場合が多く、実験の詳細方法に再検討が必要なることも判明した。それであっても、池の底からのサンプルが得られるバイオフィルム体積が大きいことが判明した。さらに、採取したサンプルにおいて、eDNA と iDNA を分離する方法と細胞外 DNA 精製を効率よく生成する方法の確立を目指した。細胞破碎前に緩衝液で洗浄を繰り返す方法と細胞破碎前に DNase を用いて eDNA を分解して、差分を観察する方法などを試した。しかし、前者では eDNA と思われる画分の DNA 量があまりに少なく、次世代シーケンサーに供する程度の量が確保できなかった。サンプル採取量を増やしたり、セルラーゼやプロテアーゼも用いてみたが、改善が見られなかった。したがって、後者の方法を採用することとした。

ついで、環境 DNA サンプルを精製し、その大量配列解読を次世代シーケンサーを用いて行った。具体的には、つくば市の池から採取したバイオフィルムサンプルを DNase で処理したものとしなかったものを用意し (各 n=3、総計 6 サンプル) それらの差分を解析することとした。それぞれのサンプルから、3000 万を超えるリード数が得られた。

得られたシーケンシング結果は、MetaWRAP のパイプラインと同様に解析した。アセンブルと Binning の結果、メタゲノムを Bin にまで処理することができた。さらに in silico での解析を進めた所、DNase 処理の有無で、abundance が統計上有意に異なる Bin がいくつか見受けられた。また、遺伝子の機能分類についても行い、いくつかの代謝経路遺伝子に差異が見られた。それとは独立に Binning に依存しない taxonomy 組成の変化について解析した所、DNase の処理の有無で、統計上有意に異なる種の存在が明らかになった。Candidatus Kryptobacter などである。これらが eDNA でリッチな種であると結論された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiyama Kentaro, Fujisawa Kazuki, Kondo Hiro, Netsu Yuya, Nishikawa Koji, Takata Yoshio, Nakamura Yuya, Kino Yuta, Ayukawa Shotaro, Yamamura Masayuki, Hayashi Nobuhiro, Tagawa Yoh-ichi, Nakashima Nobutaka	4. 巻 202
2. 論文標題 MazF activation causes ACA sequence-independent and selective alterations in RNA levels in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-019-01726-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 中島信孝、秋山健太郎
2. 発表標題 大腸菌のトキシン - アンチトキシン遺伝子による細胞休眠と遺伝子の水平伝播
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----