

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650137

研究課題名(和文) 環境微生物集団における未知微生物群の探索

研究課題名(英文) Phylogenetic distribution of rare biosphere in microbial ecosystems

## 研究代表者

片山 泰樹 (Katayama, Taiki)

独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・研究員

研究者番号：40549896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の微生物集団には、相対量の少ない多様性に富む稀少菌群が存在する。稀少菌群がどのような種の微生物で構成されているのか、これまでに知られている菌種とは系統的に異なるか？を明らかにするための研究を行った。優占菌種を予め排除する分画手法を用いて稀少菌群の系統分布を調べたところ、優占菌種とは異なる群集構造を示したが、その多くは、これまでに世界各地で発見された遺伝子の配列と系統的に全く異なる菌群ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The rare microorganisms are low abundant but accounted for most of the diversity in the community. In this study, the phylogenetic distribution and novelty of these rare microbes are explored using the fractionation of nucleic acids based on the Cot-based analysis. Our results indicated that although the community structure of rare microorganisms was different from those of abundant microbes, most of rare taxa were not always phylogenetically novel groups compared with abundant taxa and their phylogenetic diversity was not significant different with those of abundant taxa.

研究分野：環境微生物学

キーワード：稀少微生物群 遺伝子資源 生物多様性

## 1. 研究開始当初の背景

微生物は、健康、農業、持続的社會、地化学的物質循環といった社会・自然環境に中心的な役割を果たしている。環境中にどのような微生物がどれくらい存在するかを知るとは、微生物の役割を知るため、さらにそれを活用するために重要である。

近年開発された次世代シーケンサーによって大量の塩基配列解読が可能となり、従来法では捉えられなかった微生物群、稀少微生物群の存在が明らかとなった。稀少微生物群は、相対量は少ないが集団全体の多様性のほとんどを占める。集団の中での生態学的な重要性や微生物資源としての潜在的有用性が期待される一方で、その実体は明らかにされていない。大量配列解析を以てしても、PCRにより優占種由来の遺伝子が指数関数的に増幅されてしまうことによって、稀少微生物群はごくわずかにしか読み捨てていないと指摘されている(文献 )。言い換えれば、未知な稀少微生物種が未だ環境に数多く存在する可能性が強く示唆される。微生物の増殖能は種によって様々であり、大腸菌の様に試験管内で爆発的に増殖するような菌は、自然界ではむしろ稀であることは公知である。未だ人の目に触れず環境に棲息している微生物種の多様性や系統的な分布はどのようなものか、全く明らかにされていない。

現状、大量配列解析による微生物群集の多様性解析には以下の問題があり、それらを回避・排除する必要がある。PCR やシーケンシングで生み出されるエラーは配列量に比例する。これらのエラーの多くは稀少種配列としてカウントされてしまうため、稀少種の多様性が過大評価されていることが危惧されている(文献 )。また、1つの DNA 断片にたいして解読できる長さが短い上に、再シーケンスできないため、配列のエラー校正や詳細な系統解析が出来ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、大量配列解析では読み捨えない稀少微生物群の実体、つまり、存在するかどうか、存在するとすればどのような系統的多様性を示すのか、既知の遺伝子配列と比べて新規かどうか、を明らかにしようと試みる。

実際には、DNA 再会合の速度の差を利用した Cot 解析(文献 )を用いて、優占微生物群由来の核酸を予め排除した後、遺伝子解析を行う。

## 3. 研究の方法

稀少微生物群を探索する環境試料として活性汚泥を用いた。以下は、手法毎に分けて記述する。

(1)下水処理場から好気活性汚泥を採取し、フェノール/クロロホルム抽出法を用いて、全ゲノム DNA を抽出した。超音波ホモジナイザーを用いて DNA を約 1000 bp 程度の長さ

なるようにせん断し、電気泳動により確認した。

(2)調製した DNA 断片試料を熱処理により 1 本鎖に変性させた後、急冷して再会合を行った。DNA 試料を分け、DNA を溶解するリン酸緩衝液の濃度、再会合の時間を変えることで、再会合の割合を変化させた。

(3)再会合した DNA 試料を希釈し、ハイドロキシアパタイトを充填したカラムに供した。リン酸緩衝液の濃度を上げて順に展開することで、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA を順に溶出し、分画した。分光光度計を用いて分画試料の DNA 濃度を測定し、試料中に含まれる 1 本鎖 DNA の割合を算出した。

(4)分画試料の中で 1 本鎖 DNA の割合が最も高い試料を 4 つ選定し、PCR を用いて真正細菌をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子(V3 及び V4 領域:文献 )を増幅した。増幅産物の精製後、イルミナシーケンサー(Miseq システム)を用いて配列解読を行った。分画していない元の活性汚泥 DNA 試料も同様の配列解読を行った。なお、各試料の PCR 増副産物は PCR プライマーに付与したタグ配列により分別した。

(5)シーケンサーから得られた遺伝子配列は、QIIME(文献 )および Mothur(文献 )というソフトウェアを用いて解析した。先ず、以下の条件を満たす配列、低クオリティスコア、プライマー及びタグ配列が完全一致しない、ホモポリマーが 8 つ以上、キメラ配列、を除去した。エラーフィルタリングした配列を 97%相同性を基準にグルーピングし、系統解析及び群集構造の比較を行った。多様性指数はシンプソン多様性指数の逆数を用いた。元試料から検出されなかった配列、かつ、既知の細菌属種に帰属しなかったものについては、BLAST 検索に供し、既知菌種との相同性を調べた。その中で特に相同性の低い配列を 5 つ選定した。これらの配列に特異的なプライマーをそれぞれ設計し、16SrRNA 遺伝子全長配列コンティグを作成した。コンティグ作成に成功した 2 つの配列について、既知菌種配列とのアライメントを行い、系統樹を作成した。

## 4. 研究成果

Cot 解析に基づいて分画した 4 つの試料中に、元活性汚泥試料中から検出されなかった配列(=稀少菌群とする)は、約 25%~40%検出された(表 1)。この結果は、理論的には優占菌群由来遺伝子を物理的に排除したとしても、実際には相当量残ってしまうことを示している。分画試料の配列中、元試料から検出された配列を排除し、残りの稀少菌群の配列の多様性を調べたところ、分画 A 試料は元試料よりも高い値を示したが、同程度の稀

少菌群の回収率を持つ分画 B 試料では低かった(表 1)。これらのことから、従来の手法では検出されなかった稀少菌群の多様性は、従来の手法で検出された菌群の多様性と顕著な違いは無いことが示唆された。

表 1 各試料の遺伝子解析データ

試料	全配列数	稀少菌群の割合(%)	多様性指数
活性汚泥	25698	-	17.2
分画A	24313	42%	19.9
分画B	26795	37%	14.1
分画C	25973	22%	10.1
分画D	29124	26%	6.3

遺伝子解析した分画試料から、稀少菌群の回収率の最も高い分画 A を選別し、稀少菌群の系統解析を行った(図 1)。

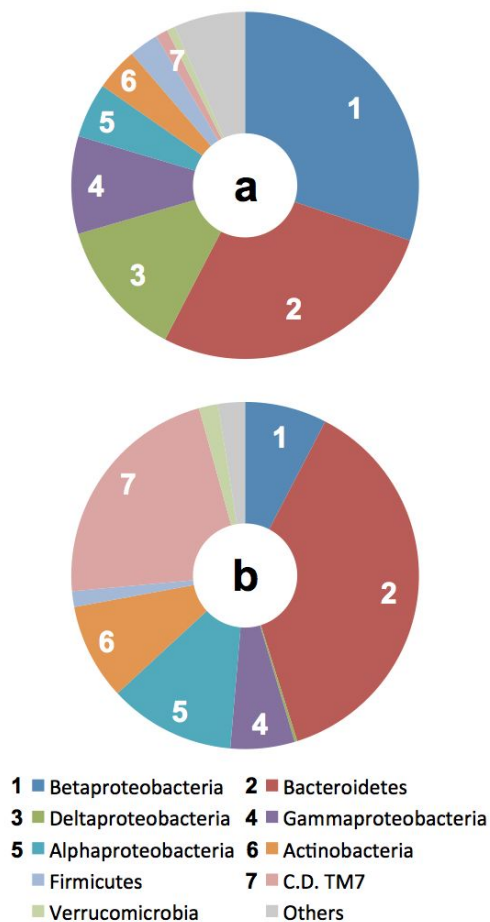


図 1 元活性汚泥試料(a)及び分画 A 試料中の稀少菌群(b)の系統分布。C.D.は Candidate Division の略。

図 1 に示す通り、元試料とは系統分布は大きく異なることが明らかとなった。元試料で優占的な Betaproteobacteria 綱や Deltaproteobacteria 綱の割合が大きく減少し、Bacteroidetes 門や Actinobacteria 門、TM7 門(候補)がより多くなった。特に、分

画 A 試料(図 1 b)から検出された Bacteroidetes 門及び TM7 門の配列の多くは、元試料(図 1 a)では検出されていなかった。この分画 A から多く検出された Bacteroidetes 門は、Flavobacteriaceae 科、Chitinophagaceae 科に帰属した。

検出された稀少菌群が、データベースに登録されている既知菌種の配列とどの程度類似度を調べたところ、分類階級の“目”や“科”のレベルで新規な配列の割合は、元活性汚泥と比較して顕著な違いは認められなかった。

検出された稀少菌群の中で特に既知配列と相同性の低いクローン B7 及び B3 について、16SrRNA 遺伝子全長配列に基づく分子系統解析を行った。他の 3 つの候補クローンは、全長配列を増幅できなかった。図 2 及び図 3 に示す通り、クローン B7 及び B3 は、Tenericutes 門、及び、Spirochaetae 門にそれぞれ帰属するが、既知の分離株ならびに環境クローンとは異なる分岐を示していることが分かる。これらの結果は、これまでに知られている細菌の系統群とは遠縁の配列が分画試料から検出されていることを示している。

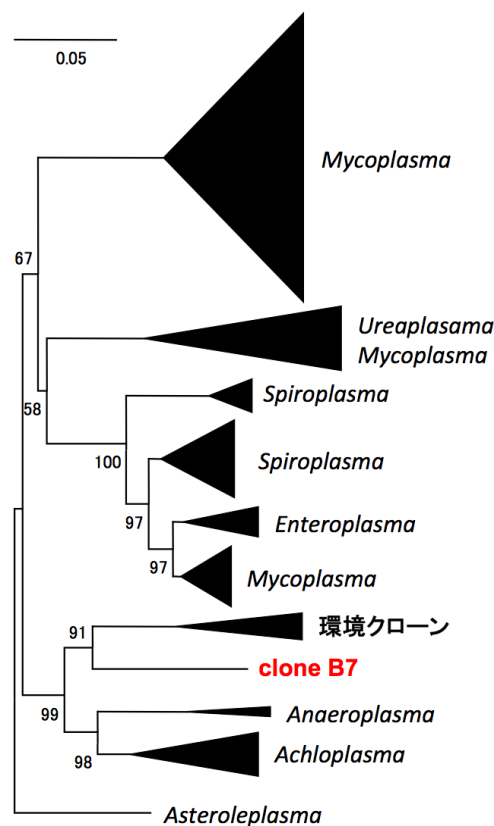


図 2 クローン B7 と Tenericutes 門に帰属する既知菌種及び環境クローンの系統樹。クローン B7 を赤字で示した。既知菌種は属ごとにクラスター分けして表示した。分岐の数字はブーツストラップ値を示す。バーは 100 塩基中 5%の割合で置換する長さを示す。

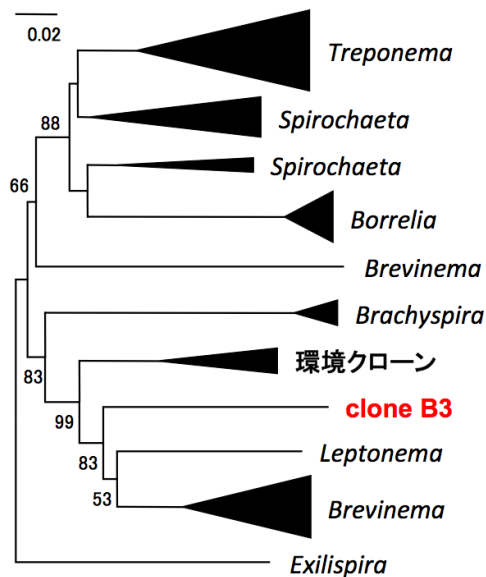


図3 クローン B3 と Spirochaetae 門に帰属する既知菌種及び環境クローンの系統樹。図の説明は図2と同じ。

以上の結果から、Cot 解析理論に基づく分析手法を施すことによって、優占菌群と稀少菌群を区別せず微生物集団を構造解析しただけでは検出できなかった系統群（例えば TM7 門）が存在することが明らかとなった。従来手法で得られる配列と比較して、系統分布は異なったものの、多様性や配列の新規性において顕著な違いは認められなかった。

環境中の微生物種の新規性の割合は研究対象とする環境に大きく依存するため、本研究と同様な手法を用いた場合、他の自然環境中の稀少菌群の多様性、系統分布を調べることが今後の課題となる。

< 引用文献 >

- Gonzales et al., PLoS One, 7: e29973, 2012.  
 Reeder & Knight, Nat Methods, 7: 668-669, 2010.  
 Peterson et al., Genome Res, 12: 795-807, 2002.  
 Ellis et al., PLoS One, 8:e54783, 2013.  
 Caporaso et al., Nat Methods, 7: 355-336, 2010.  
 Schloss et al., Appl Environ Microbiol, 75: 7537-7541, 2009.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
 出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 泰樹 (Katayama, Taiki)

産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部  
 門・主任研究員

研究者番号：40549896