

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840142

研究課題名(和文)好塩性古細菌Halobacteriaceae科の明確な系統分類

研究課題名(英文)Further refinement of the phylogeny of the Halobacteriaceae

## 研究代表者

峯岸 宏明(Minegishi, Hiroaki)

東洋大学・工業技術研究所・奨励研究員

研究者番号：30440019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オーソログス16S rRNAおよびRNAポリメラーゼ遺伝子群による系統解析によりHalobacteriaceae科は少なくとも大きく二つのグループに分かれることが示唆された。またDNA-DNAハイブリダイゼーションが属分離にも有効である可能性を示せた。その結果、Halococcus属は3属に分離可能であることが明確となった。また、Halobacteriaceae科の殆どすべての種においてピルビン酸が栄養源として非常に有用であることが示された。本研究で得られたデータにゲノム解析データやさらなる表現型データを加えることにより、Halobacteriaceae科の明確な分類は可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A considerable number of species of the Halobacteriaceae possess multiple copies of the 16S rRNA gene that exhibit more than 5% divergence, complicating phylogenetic interpretations. In this study, the family Halobacteriaceae was suggested to split into at least two major groups by the phylogenetic analysis using orthologous 16S rRNA and DNA dependent RNA polymerase subunit H, B' and B' gene sequences. Furthermore, DNA-DNA hybridization was effective to the genera separation in addition to the species separation in the family Halobacteriaceae. As a result, the genus Halococcus were divided into three groups. Polar membrane lipids analysis of Halococcus species was also supported this result. In the phenotype analysis, Pyruvic acid was almost useful as a nutritional source of haloarchaea. By adding genome analysis data and additional phenotypic data on the data obtained in this study, further refinement of the phylogeny of the Halobacteriaceae is possible.

研究分野：生物多様性・分類

キーワード：好塩性アーキア Halobacteriaceae科 オーソログス16S rRNA遺伝子 RNAポリメラーゼ遺伝子群

### 1. 研究開始当初の背景

様々な生物群を構成している種の系統学的関係を決定する際にはリボソームの小サブユニットを構成する RNA の塩基配列が広く用いられている。原核生物は 16S rRNA 遺伝子の相同性が 97% 以下であれば別種であると推定できるなど、微生物系統分類において重要な指標となっている。しかし、多くの生物種において複数の異なるコピーが存在する、形態的特徴を重んじてきた従来の分類体系と相違がある、DNA-DNA 相同性との相関がないなど、多くの問題も指摘されている。

Halobacteria 綱 Halobacteriales 目 Halobacteriaceae 科は古細菌最大数のグループである。属種の同定においては極性脂質組成、16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの相関値が特に重要な要因となっている。しかし、Halobacteriaceae 科では多くの種において複数の 16S rRNA 遺伝子コピーが存在し、その中にはコピー間の相同性が低いものもあり、各々の配列で系統樹のトポロジーが大きく異なることが指摘されている。

このような問題を解決すべく、申請者らは DNA 依存型 RNA ポリメラーゼのサブユニット B' (*rpoB'*) 遺伝子の完全長配列を用いてその系統関係を解析した (Minegishi et al., 2010)。その結果、16S rRNA 遺伝子では明確に区別できない分類群が明瞭に分けられるなど、分類指標として非常に有用であることが分かった。

さらに申請者らは公開されているゲノムデータから 16S rRNA 遺伝子上流に十数個からなる遺伝子アレイが存在し、そのアレイの向きで subgroup 1 と subgroup 2 の 2 つのグループに分けられることを見いだした (図 1)

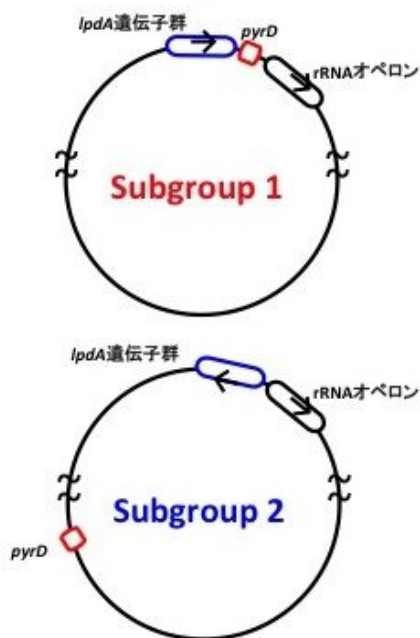


図 1. rRNA オペロン周辺の遺伝子地図

ジヒドロオロテット酸デヒドロゲナーゼ (*pyrD*) またはジヒドロリポアミド酸デヒドロゲナーゼ (*lpdA*) 遺伝子から 16S rRNA 遺伝子をはさみ 23S rRNA 遺伝子までの DNA 断片を増幅するために 2 種類のプライマーセットを設計し、*pyrD* セットだけで増幅するものと、*lpdA* セットでだけ増幅するものに二分されることを実験的に証明した。そこで、16S rRNA 遺伝子を 2 本以上有する *Haloarcula* 属の分類体系を明確化するために *pyrD* セットだけで増幅した完全長 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析し、これがオーソログな 16S rRNA 遺伝子である可能性を見いだした (Minegishi et al., 2012)。しかしながら、Halobacteriaceae 科に関して遺伝型解析により現れてくる系統樹のクラスターと、その内部の表現型 (生育塩濃度、温度、pH 範囲、極性脂質組成など) との明確な相関関係は得られていない。

### 2. 研究の目的

本研究提案では、遺伝子型解析および同一条件における表現型解析を行うことにより、Halobacteriaceae 科の系統関係を明確化する。遺伝子型の解析は、入手可能な Halobacteriaceae 科の基準種およびこれまで分離してきた Halobacteriaceae 科に属する新規好塩性アーキアのオーソログな 16S rRNA 遺伝子および RNA polymerase サブユニット H、B'、B'' 遺伝子を解析し、その系統関係を調べ、さらに DNA-DNA 相関値が種の分離基準とだけでなく属の分類基準として有用であるかを調べた。また、これら遺伝子型データと極性脂質の TLC 展開パターンが一致するかを調べた。さらに、表現型解析結果から Halobacteriaceae 科の系統関係を明らかとする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

遺伝子型解析を行うにあたり、入手可能な菌株を全種培養した。オーソログな 16S rRNA 遺伝子および解析用の DNA は抽出キットを用い、DNA-DNA ハイブリダイゼーションに使用するゲノム DNA は酵素処理後にフェニール/クロロホルム法を用いて精製し、アルコール沈殿法により回収した。

#### (1) オーソログな 16S rRNA 遺伝子の解析

subgroup 1 のオーソログな 16S rRNA 遺伝子は、*pyrD2* フォワードプライマー (5'-TCGTTGTTNARNCCCATNCGGTT-3') および 23S Rev2 リバースプライマー (5'-GCTTWTGCGCAGCTTGG-3') を使用し、98 20 秒の熱変成、52 30 秒のアニーリング、72 1 分 30 秒の伸長を 35 回繰り返し増幅させた。増幅後の断片は酵素処理後にサンガー法によりその塩基配列を決定した。

一方、subgroup 2 の系統群は *lpdA* フォワードプライマー (5'-CTGAACYACGGYTGATCC-3') および 23S Rev2 リバースプライマーを使用し、98 20 秒の熱変成、56 30 秒の A

ニーリング、72 2分30秒の伸長を35回繰り返し増幅させた。増幅後の断片は酵素処理後にサンガー法によりその塩基配列を決定した。

#### (2) RNA ポリメラーゼ遺伝子群の解析

RNA ポリメラーゼ遺伝子群 (*rpoH*, *rpoB'* および *rpoB''*) の増幅は2種類のプライマーセットを用いて増幅した。

*rpoH* および *rpoB''* 遺伝子の増幅には HrpO<sub>H</sub>-47F フォワードプライマー (5'-CTGTAGTATCYCGTGANAG-3') と HrpO<sub>B</sub>-38R リバースプライマー (5'-CCGTTNACGTANACYTTNGC-3')、*rpoB'* 遺伝子の増幅には HrpO<sub>B2</sub>-1420F フォワードプライマー (5'-TGTGGGCTNGTGAAGAACTT-3') と HrpO<sub>A</sub>-153R リバースプライマー (5'-GGGTCCATCAGCCC CATGTC-3') を使用し、98 20秒の熱変成、52 30秒のアニーリング、72 2分の伸長を35回繰り返し増幅させた。増幅後の断片は酵素処理後にサンガー法によりその塩基配列を決定した。

#### (3) DNA-DNA 相同値の解析

DNA-DNA ハイブリダイゼーションは Ezaki らの方法を用いて行った (Ezaki et al., 1989)。抽出したゲノムDNAをフルオロ Nunc モジュールプレートに固定し、フォトビオチン標識したDNAをハイブリダイズさせ、その蛍光強度を測定し、相同値を算出した。

#### (4) 極性脂質解析

リン脂質および糖脂質の解析は Kamekura の方法を用いた (Kamekura, 1989)。培養菌体を緩衝液に懸濁後にクロロホルム/メタノール溶液で処理し、クロロホルム層に溶け込んだ脂質を回収した。回収試料は HPTLC プレートで展開した。

その他の表現型解析は、Oren らの方法に従って行った (Oren et al., 1997)。

### 4. 研究成果

本研究申請時に43属148種であった *Halobacteriaceae* 科に属する好塩性古細菌はわずか3年の間に7属65種が新規分類群として提唱され50属213種まで膨れ上がった。これまでの伝統的な手法により提唱された新規分類群が加わった事により、その系統関係はより複雑化してきた。

そこで、日本国内で入手可能な基準種のオーソロガス16S rRNA 遺伝子およびRNAポリメラーゼ遺伝子群を解析した。その結果、これまでの解析同様に、新規に提唱された分類群も *pyrD*-23S Rev2 プライマーセットと増幅する subgroup 1 と *lpdA*-23S Rev2 プライマーセットで増幅する subgroup 2 の2つのグループに分けられる事が分かった。この配列を基に近隣結合法を用いて系統樹を構築した結

果、系統樹においても subgroup 1 と subgroup 2 に別れた (図2)。

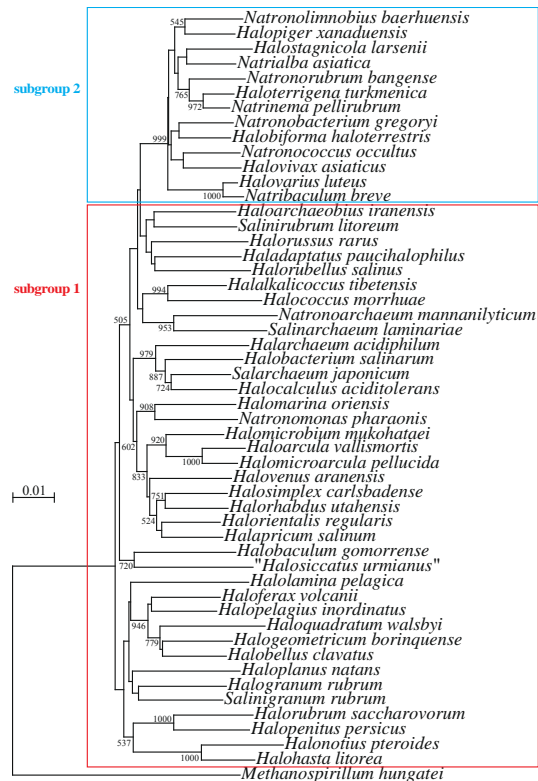


図2. *Halobacteriaceae* 科の基準種基準株のオーソロガス16S rRNA 遺伝子による近隣結合樹。入手できなかった株に関しては登録配列を使用した。

Subgroup 1 は *Haloarchaeobius*, *Salinirubrum*, *Halorussus*, *Haladaptatus*, *Halorubellus*, *Halalkalicoccus*, *Halococcus*, *Natronoarchaeum*, *Salinarchaeum*, *Halarchaeum*, *Halobacterium*, *Salarchaeum*, *Halocalculus*, *Halomarina*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Haloarcula*, *Halomicroarcula*, *Halovenus*, *Halosimplex*, *Halorhabdus*, *Halorientalis*, *Halapricum*, *Halobaculum*, “*Halosiccatus*”, *Halolamina*, *Haloferax*, *Halopelagius*, *Haloquadratum*, *Halogeometricum*, *Halobellus*, *Haloplanus*, *Halogranum*, *Salinigranum*, *Halorubrum*, *Halopenitus*, *Halonotius*, *Halohasta* の37属で構成され、subgroup 2 は *Natronolimnobius*, *Halopiger*, *Halostagnicola*, *Natrrialba*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Halobiforma*, *Natronococcus*, *Halovivax*, *Halovarius*, *Natribaculum* の13属であった。

*rpoB'* 遺伝子に関して同様にしてもその塩基配列を基に近隣結合法を用いて系統樹を構築した結果、オーソロガス16S rRNA 遺伝子と同様に *Halobacteriaceae* 科は subgroup 1 と subgroup 2 に分かれ (図3)。その構成はオーソロガス16S rRNA 遺伝子の結果と一致していた。



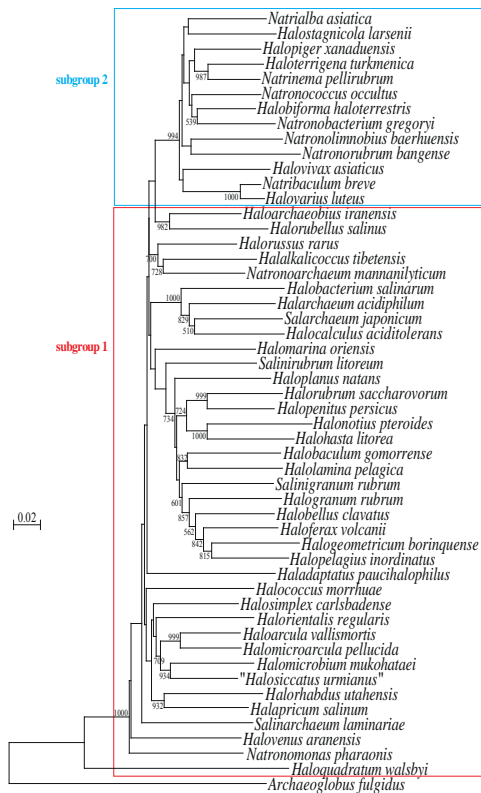


図 3 *Halobacteriaceae* 科の基準種基準株の *rpoB* 遺伝子による近隣結合樹。

*rpoH*, *rpoB* 遺伝子に関しても同様の結果が得られ、*Halobacteriaceae* 科は二つのグループに大きく分かれることが示唆された。

2015 年 Gupta らはゲノム情報を基に *Halobacteria* 綱を *Halobacteriales* 目 *Halobacteriaceae* 科、*Haloferacales* 目 *Haloferacaceae* 科、*Natrialbales* 目 *Natrialbaceae* 科の 3 目 3 科に分ける提案を *IJSEM* 誌上で発表した。彼らの提案と比較すると、subgroup 1 は *Halobacteriales* 目 *Halobacteriaceae* 科と *Haloferacales* 目 *Haloferacaceae* 科に二分され、subgroup 2 は *Natrialbales* 目 *Natrialbaceae* 科となりほぼ一致していた。

しかしながら、*Salinarchaeum* 属は本研究では subgroup 1 に帰属するのに対し、彼らの提案では *Natrialbales* 科、つまり subgroup 2 に帰属していた。また、subgroup 1 に属する *Halobaculum* 属は Gupta らの分類では *Haloferacaceae* 科に帰属されているが、オーソログス 16S rRNA 遺伝子の系統樹ではその結果がサポートされなかった。

また、2016 年に Gupta らは *Halobacteria* 綱の *Halobacteria* 目を *Halobacteriaceae* 科、*Haloarculaceae* 科、*Halococcaceae* 科の 3 科に、*Haloferacales* 目を *Haloferacaceae* 科、*Halorubraceae* 科に 2 科に再分類する提案を行ったが、オーソログス 16S rRNA 遺伝子、RNA ポリメラーゼ遺伝子群の系統解析共に Gupta らの結果とは一致しなかった。今後、明確化するためにはさらなる解析が必要で

ある。

DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果では属内の相同値は約 30-60% の範囲内に収まり、他属との相同値は、一部例外はあるものの 30% 以内に収まった。しかしながら、*Halococcus* 属においては大きな矛盾が見られた。*Halococcus hamelinensis* との相同値は他の全ての *Halococcus* 属との間で 30% 以下であった。*Halococcus morrhuae* についても *Hcc. saccharolyticus*, *Hcc. salifodinae*, *Hcc. agarilyticus* との相同値は 30% 以下であった。この結果は、*Halococcus* 属が 3 属に分かれることを示唆していた。また、*Halococcus* 属間でオーソログス 16S rRNA 遺伝子の相同性を比較した結果も同様であった。RNA ポリメラーゼ遺伝子群の結果も同様の結果をサポートしていた。

これまで極性脂質解析は、*Halobacteriaceae* 科の属分離の指標として用いられてきた。しかしながら、その解析は属種が増えるにつれその近縁種のための解析となってきた。本研究では、全種を同様の方法にて膜脂質を抽出し、HPTLC プレートにて解析を行った。その結果、多くの属でその種間のリン脂質のパターンは一致していた。また、糖脂質についても欠損等の違いはあるものの多くの属において一致していた。しかしながら、*Halococcus* 属に関しては、1) *Hcc. hamelinensis*、2) *Hcc. dombrowskii*、*Hcc. morrhuae*、*Hcc. qingdaonensis*、*Hcc. thailandensis*、*Hcc. sediminicola*、3) *Hcc. agarilyticus*、*Hcc. saccharolyticus*、*Hcc. salifodinae* の 3 つに分かれた (図 4)。

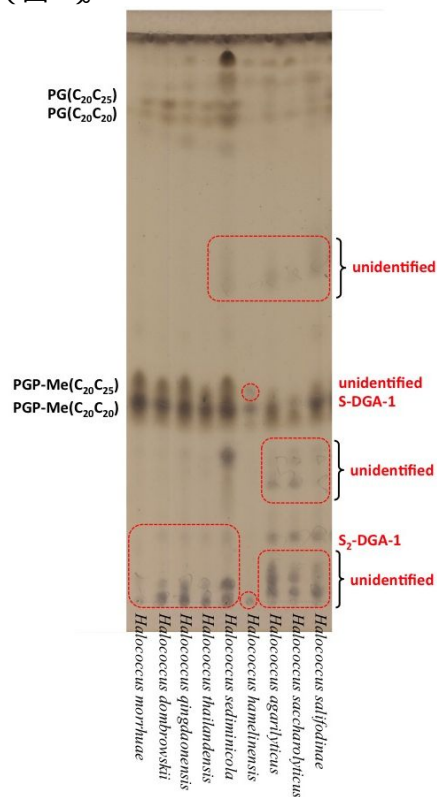


図 4. *Halococcus* 属 9 種における極性脂質解析

この結果は、オーソロガス 16S rRNA および RNA ポリメラーゼ遺伝子、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果と一致していた。また、同一の培地でその他の同定試験を行ったところ、G+C 含量、抗生物質感受性試験、増殖最適条件などの結果においても *Halococcus* 属が 3 属に分かれることを強く示唆していた。

表現型解析においては *Halobacteriaceae* 科の多くの中性菌が JCM No. 442 培地で増殖可能であったが、新属新種の増加に伴いこの培地で増殖できない株が存在した。さらに、同種間においても同一培地で生えない種が存在することも明らかとなった。しかしながら、pH 9.0 以上に増殖指摘を持つアルカリ菌に関しては JCM No. 166 および 167 培地で増殖可能であった。また、好酸性好塩性アーキアである *Halarchaeum* 属に関しては分離培地でのみ増殖が確認できた。

表現型解析は微生物の分類に取って必須であるにも関わらず、その培地や研究室単位によってその結果が異なる。本研究では、同一培地による試験を目指したが、困難を極めた。しかしながら、*Halobacteriaceae* 科の殆どすべての種においてピルビン酸が栄養源として非常に有用であることが示された。

本研究により、*Halobacteriaceae* 科は少なくとも大きく二つのグループに分かれることが示唆された。また、DNA-DNA ハイブリダイゼーションが属分離にも有効である可能性が示された。その結果、*Halococcus* 属は 3 属に分離可能であることが明確となった。

今後も *Halobacteria* 綱の好塩性アーキアは増え続け、その系統関係は複雑化していくと考えられる。本研究で得られたデータにゲノム解析データやさらなる表現型データを加えることにより、*Halobacteriaceae* 科の明確な分類は可能になると考えられる。

#### < 引用文献 >

- Minegishi H, et al. (2010) Further refinement of the phylogeny of the *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (*rpoB'*) gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2398-2408.
- Minegishi H, et al. (2012) Gene orders in the upstream of 16S rRNA genes divide genera of the family *Halobacteriaceae* into two groups. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 188-195.
- Oren A, et al. (1997) Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* 47, 233-238.
- Ezaki T, et al. (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224-229.

Kamekura M (1993) Lipids of extreme halophiles. In *The Biology of Halophilic Bacteria*, pp. 135-161. Edited by R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. Boca Raton, FL: CRC Press.

Gupta RS, et al. (2015) Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 1050-1069.

Gupta RS, et al. (2016) A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 109,565-587.

#### 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2件)

Minegishi H, Echigo A, Kuwahara A, Shimane Y, Kamekura M, Itoh T, Ohkuma M, Usami R. *Halocalculus aciditolerans* gen. nov., sp. nov., an acid-tolerant haloarchaeon isolated from commercial salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 査読有り, 2015, 65(Pt 5), 1640-1645.

Minegishi H, Echigo A, Shimane Y, Kamekura M, Itoh T, Ohkuma M, Usami R. *Halococcus agarilyticus* sp. nov., an agar-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 査読有り, 2015, 65(Pt 5), 1634-1639.

[学会発表](計1件)

Hiroaki Minegishi, Proposal to emend the descriptions of three orders *Halobacteriales*, *Haloferacales* and *Natrialbales* in the class *Halobacteria*. *Halophiles2016*, 2016年5月22-27日, San Juan (Puerto Rico)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

峯岸 宏明 (MINEGISHI, Hiroaki)  
東洋大学・工業技術研究所・奨励研究員  
研究者番号: 30440019