

海底下堆積物中に優占する *Chloroflexi* 門バクテリアの分離・培養

水圏土壌環境研究室 中原 望

指導教員 山口 隆司 教授、幡本 将史 産学融合特任准教授

1. 研究背景

海底下堆積物環境は、地球における重要な物質循環の場である。その物質循環の役割を担っているのが、微生物であり、海底下には 2.9×10^{29} 細胞個にも上る膨大な数の微生物細胞が存在している¹⁾。一方で、16S rRNA 遺伝子解析を用いた研究によって海底下に優占的に生息するほぼすべての微生物は、人為的に培養されたことがない未培養系統分類群に属することが明らかとなっており、個々の微生物の詳細についての理解はほとんど進んでいないのが現状である。しかしながら、海底下に優占的に生息する未培養微生物群は系統分類学において新しい門、綱や目を代表するような高次系統分類群に属していることから、非常に興味深い研究対象であると言える。このことから、それらの微生物群を分離・培養し、その詳細を解明することができたならば、新しい代謝・遺伝子の発見や生物界全体の進化の再考に繋がる発見等、生物学における新しい発見が十分に期待できる。加えて、急速に発展を遂げている環境ゲノム解析 (メタゲノム解析やシングルセルゲノム解析) により、環境中に生息する培養が困難な微生物の代謝機能が次々と明らかにされている。環境ゲノム解析は、未培養微生物の代謝情報を獲得するには強力なツールであるが、あくまで遺伝子配列から得られた微生物細胞の生態を示唆する間接的な証拠でしかない。ゆえに、培養された微生物細胞を基にしなければ、海底下環境中で発見されている反応 (嫌氣的メタン酸化反応等) を証明することは難しい。したがって、海底下の未培養微生物を分離・培養するということは、地球における物質循環の包括的な理解の促進および生物学の基礎情報の拡充と深化につながると言える。

本研究では 16S rRNA 遺伝子に基づいた解析により海底堆積物中に普遍的かつ優占して存在することが知られている *Chloroflexi* 門に属する未培養バクテリアの分離・培養を目的とした。本研究では、異なる 2 種類の *Chloroflexi* 門バクテリアの集積培養に成功しており、分離・培養を効率的に進めるために、ゲノム解析等の遺伝子解析技術を併用しながら進めている。

2. 実験方法

2.1 *Chloroflexi* 門細菌の集積培養物

本研究では 2 種類の *Chloroflexi* 門バクテリアの集積培養系を得ている。1 つは *Anaerolineae* 綱の新目を代表するバクテリア (以下、MO-CFX2 株) を含む集積培養系、もう 1 つは *Dehalococcoidia* 綱の新しい目を代表するバクテリア (以下、GIF9 バクテリア) を含む集積培養系である。これら 2 つの集積培養系は、青森県八戸市沖 (水深 1,180 m) および三重県熊野市沖 (水深 2,533 m) から採取された海底堆積物を投入した、下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge; DHS) リアクターで前培養された嫌気性微生物群集を植種源として、数年以上に渡る長期間の培養の後に得られた^{4,5)}。これら集積培養系は、20 ml の培地が入った容量 50 ml のバイアル瓶を用いて継代培養を行っている。培地の基本組成は海水を模擬した人工海水であり、微量金属類とビタミン類を添加している。本培地は窒素ガスによる曝気、還元剤 (硫化ナトリウムとシステイン) の添加とバイアル瓶を密閉することで嫌気的条件が保たれている。

2.2 定量 PCR およびゲノム解析

集積培養液の濁りによる細胞の増殖が確認出来ない GIF9 バクテリアの増殖確認には、定量 PCR を用

いた。

ゲノム解析には Illumina 社の次世代シーケンサー MiSeq を用いた。MO-CFX2 株については、ゲノム解析に必要な DNA 量を確保するために、1 L の培養系から DNA を抽出した。その後、MiSeq を使った Paired-End と Mate-Pair Sequencing 法により MO-CFX2 バクテリアのドラフトゲノムの決定を行った。続いて、GIF9 バクテリアについては、ゲノム解析を行うための十分な DNA を確保することが難しかったため、現在の集積培養系から DNA を抽出してゲノム解析を行った。得られたゲノム情報は CLC Genomics workbench を用いてアセンブルを行い、BLAST プログラムによる相同性検索、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) および RAST サーバー等を用いて代謝経路の推定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 MO-CFX2 バクテリアを含む集積培養系

MO-CFX2 株を含む最初の集積培養系は、青森県八戸市沖で採取された有機物を多く含む海底堆積物を DHS リアクターで前培養した、メタン生成微生物群集を植種源として得られた⁴⁾。最初の集積培養条件は、エネルギー源および炭素源として酢酸と酵母抽出液を添加した培養系で得られた。現在はグルコース、酵母抽出液、トリプトンとカザミノ酸等の様々な種類の有機物を添加し、30 °C で培養を行っている。本集積培養系は安定的な継代培養はできてはいるものの、約 3 ヶ月に一度しか継代培養できず、かつ菌体収量が低いことが問題となっている。加えて、本集積培養系には 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析の結果から、*Anaerolineae* 綱の新目を代表する MO-CFX2 株の 1 種類しかいないと推定はしているが、顕微鏡観察から MO-CFX2 株と思われる少し太めの長い桿菌以外の細胞も観察されることがあったことから、この培養系の純粋性には疑問が残っていた。これらのことから、本 MO-CFX2 株の詳細な特徴を調査していくことが困難な状況にあった。そこで、本集積培養系に対してメタゲノム解析を行った。得られたゲノム情報から推定される代謝経路に基づいて培養条件を至適化していくことで、MO-CFX2 株を効率的に培養することが可能となると考えた。

3.2 MO-CFX2 バクテリアのゲノム解析と代謝経路に基づいた培養条件の検討

ゲノム解析結果から推定されたゲノムサイズは、6.3 Mbp であり、平均 GC 含量は 65% であった。最終的に得られたコンティグ数は 12 本になった。現在、サンガー法を用いてコンティグ間の繋がりを確認しながら、全ゲノム配列の決定を進めている。本ゲノム解析で明らかとなった重要なことの 1 つは、16S rRNA 遺伝子配列が MO-CFX2 株のものしか検出されなかったことである。つまり、本集積培養系は集積培養系ではなく MO-CFX2 バクテリアの 1 種類の純粋培養系であることが強く示唆された (Fig. 1 (A))。

詳細なゲノム解析の結果から、MO-CFX2 株は、乳酸発酵と硝酸還元が可能であることから、その両方を使用できる通性嫌気性細菌であることが示唆された。主要な代謝経路である解糖系および TCA 回路は、ほぼ完全であることがわかった。このことから、糖が解糖系で代謝されたのち、TCA 回路に入ることでエネルギーを得ていることが示唆された。また、代謝経路から推察された培養系にて、MO-CFX2 株の培養を行ったところ、硝酸、乳酸お

よび二糖類が存在している培養条件 (Fig.1 (B)) では、これまで使用していた培養系 (Fig.1 (A)) と比べて生育が促進したことがわかった。この結果から、本研究におけるゲノム情報に基づいた培養を行うことで生育の促進が可能となることが明らかとなった。

また、本研究におけるゲノム解析から、脱ハロ呼吸に関わる鍵遺伝子である reductive dehalogenase gene (rdh) がアノテーションされた。さらに、rdh 遺伝子の他に脱ハロ呼吸に関わる遺伝子群 (*CprTKZEBACD*)⁹⁾も検出されたことから、*Chloroflexi* 門 *Dehalococcoidia* 綱以外で脱ハロ呼吸で生育している可能性がある微生物の発見となった。今後、MO-CFX2株の詳細な菌学的特徴を解明することで、環境中に存在する有機ハロゲン化合物の消費を再評価する上で、非常に期待できる結果が得られた。

3.3 GIF9 バクテリアを含む集積培養系

GIF9 バクテリアを含む集積培養系は三重県熊野市沖のメタン冷湧水帯で採取した海底堆積物を DHS リアクターで前培養した嫌氣的メタン酸化微生物群集を植種源として得られた⁵⁾。最初の集積培養系にはエネルギー源および炭素源としてカザミノ酸と数種類の抗生物質を添加したもので、現在は、カザミノ酸と抗生物質に加え、メタン生成アーキアの増殖を阻害するために2-ブロモエタンスルホン酸を添加した条件で培養を行っている。培養温度は20°Cである。本集積培養系は、微生物細胞の増殖の濁度により明瞭に判定できない程度にしか増殖を確認することができない。4回の植え継ぎ後、集積培養系を位相差顕微鏡で観察したところ、形態学的に少なくとも2種類の微生物が存在し、1つは少し曲がった桿菌であり、もう1つは直径が1μmより小さな球菌であった。次に、どのような微生物種が本集積培養系に存在しているかを確認するために、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。合計44個のクローンを解析した結果、24クローンが *Desulfovibrio* 属バクテリアであり、残り20クローンは *Dehalococcoidia* 綱の GIF9 目に属するバクテリアであった。この結果は本培養系が GIF9 バクテリアを45%程度含む高度な集積培養系であることを強く示唆していた。加えて、FISH法により細胞形態を確認したところ、直径が1μm以下の小さな球菌であることがわかった。しかしながら、DAPI像と特異的なプローブを用いた場合を比較すると、菌体の位置が少しずれていたことから、細胞形態を確実に決定することはできなかった。これらのことから、FISH法と顕微鏡観察の結果から GIF9 バクテリアは、1μm以下の小さな球菌であることが示唆された。さらに、本集積培養系は1回の継代培養で細胞の増殖が確認出来るまでに約3ヶ月かかり、そして菌体収量が目視で確認することが困難であった。そこで、集積培養系に対してメタゲノム解析を行うことで、GIF9 バクテリアを効率的に培養できる条件を検討した。

3.4 GIF9 バクテリアのゲノム解析

推定される GIF9 バクテリアのゲノムサイズは2.3 Mbp であり、その平均 GC 含量は55%であった。主要な代謝経路である解糖系はほぼ完全であった。TCA 回路については、不完全であり、クエン酸およびイソクエン酸を生成する遺伝子がアノテーションされなかった。しかしながら、これらの遺伝子がなくても2-oxoglutarate から oxaloacetate までは TCA 回路を回すことができるため、アミノ酸分解 (Glutamate/Glutamine) により得られた 2-oxoglutarate を使用して糖新生を行っていることが示唆された (Fig.2 (A))。このことから、ゲノム解析から明らかとなった代謝経路と培養系内のエネルギー源および炭

素源がアミノ酸しかないことから、アミノ酸分解により生育していることが考えられた。さらに、本研究で得られた GIF9 バクテリアの集積培養系内において存在している、*Desulfovibrio* 属バクテリアが Glycine を利用できない⁷⁾ことがわかっている。したがって、GIF9 バクテリアの純粋分離を行うために Glycine を出発物質とした培養条件を検討した。Glycine の分解では最終生成物として水素が発生することがわかっていることから (Fig.2 (B))、培養系内の水素を資化するため、海底堆積物から分離されたメタン生成菌の *Methanobacterium* sp. strain MO-MB1²⁾との共培養を実施した。今後は、菌体の増殖を定量 PCR にてコピー数の定量を行い、本集積培養系の培養条件の最適化を行う。

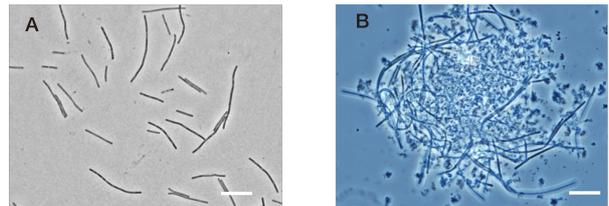


Fig. 1 Microphotograph for strain MO-CFX2. (A) Photograph showing the growth of strain MO-CFX2 in the liquid basal medium supplemented with 10mM glucose + 0.1% Yeast Extract + 0.1% Tryptone + 0.1% casaminoacids + 10mM pyruvate. (B) In the liquid basal medium supplemented with 10mM glucose + 10mM trehalose + 10mM sucrose + 0.1% Yeast Extract + 10mM Lactate + 0.1% Tryptone + 0.1% casaminoacids and 10mM sodium nitrate. Bars indicate 10 μm.

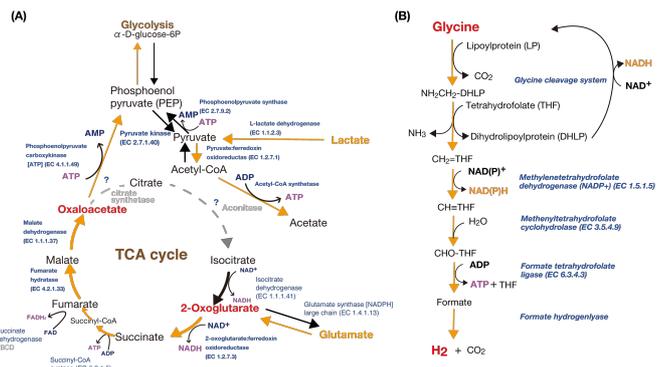


Fig. 2 Predicted metabolism for enrichment culture of GIF9. Grey colored enzyme was not detect in draft genome.

4. まとめ

本研究では、ゲノム情報を用いて MO-CFX2 バクテリアの菌体収量を増加させることができた。さらに、脱ハロゲン呼吸が可能であることから、MO-CFX2 株の詳細な生理学的特徴の解明に期待できる結果となった。

また、GIF9 バクテリアを45%以上含む集積培養系を得ることができ、ゲノム解析から詳細な代謝経路を理解することができ、その情報を用いた培養系を作成することで効率的な分離を試みる事ができた。

参考文献

- 1) Kallmeyer, J. et al. *PNAS*, vol 109 (40) pp.16213-16216. (2012)
- 2) Wasmund et al., *ISME J*, ;8(2):383-397 (2013)
- 3) Ruff et al. *PNAS*, 112(13):4015-4020 (2015)
- 4) Imachi et al., *ISME J*, vol 5, pp.1913-1925. (2011)
- 5) Aoki et al., *PLoS ONE*, vol 9 (8) e105356-14. (2014)
- 6) Kruse et al., *Journal of Bacteriology*, 197(5):893-904. (2015)
- 7) Finster et al., *Antonie van Leeuwenhoek*, 97:221-229. (2010)