

難培養性細菌種のゲノム完全長配列取得による機能解明

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	本郷, 裕一
発行元	土壌微生物研究会
巻/号	64巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 77-80
発行年月	2010年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シンポジウム

難培養性細菌種のゲノム完全長配列取得による機能解明

本郷裕一*

東京工業大学大学院生命理工学研究科, 〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1-W3-48

Functional analysis of uncultured bacterial species by acquiring their complete genome sequences

Yuichi Hongoh*

Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology,
O-okayama 2-12-1-W3-48, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

Key words : uncultured, whole genome amplification, gut bacteria, termite, single-cell genomics

1. はじめに

環境中の大部分の細菌種は現時点で培養不能である。そうした細菌種の生理・生態は未知のままで、生物資源としての応用も困難である。

1990年代から盛んになった small subunit rRNA 配列を分類マーカーとする分子生態学的研究により、難培養種も含む環境微生物群集の構造が徐々に明らかとなってきた。特定の機能だけに着目するならば、関連遺伝子の PCR 増幅や *in situ* hybridization, stable isotope probing などの手法を用いての研究も可能である。また近年では、微生物群集全体の DNA を抽出・断片化して網羅的に配列決定する、メタゲノム解析が普及している。メタゲノム解析により、群集全体としての機能の解明と、有用遺伝子のスクリーニングが可能となった。しかし、依然として、個々の難培養微生物種の詳細な機能は未知のままである。

そこで筆者は、個々の難培養微生物種の少数の細胞からゲノム完全長配列を取得することにより、その微生物種の機能を解明することを目指してきた。以下にその結果と、これからの展望を記す。

2. ヤマトシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌 Rs-D17 のゲノム解析

シロアリは枯死植物体のみを摂食する社会性昆虫で、木材の大害虫だが、地球の炭素循環に必須の役割を果たしている。近年では、木質由来バイオ燃料開発への応用という観点からも脚光を浴びている。しかし、その高効率な木質分解能力をもたらす腸内微生物群の大部分は培養成功例がほとんどなく、数百種からなる個々の構成種の機能は未知のままであった²⁻⁵⁾。

ゲノム解析の標的としたのは、シロアリ腸内原生生物(単細胞真核生物)の細胞内にだけ生息する Termite Group 1 (TG1) 細菌の一種である。TG1 は未培養真正細菌門の一つで、多様なシロアリ腸内原生生物種の種特異的な細胞内共生細菌である^{8,14)}。しかし、機能については全く未知であった。筆者らは、その TG1 細菌門に属する、Rs-D17 と名付けた培養不能細菌種のゲノムを解読することを目指した(図1)。Rs-D17 の宿主は、ヤマトシロアリ腸内でセルロース分解を担う培養不能原生生物 *Trichonympha agilis* で^{1,14)}、複数系統の混入を避けるため、宿主1細胞のみをマイクロマニピュレーターで物理的に単離して用いた。原生生物細胞膜を界面活性剤で緩やかに破壊し、漏出した細胞内共生 Rs-D17 細菌を数百細胞、毛細管で回収した。

細菌ゲノムの完全長配列取得には通常10億個以上の細胞が必要である。そこで、回収した Rs-D17 細胞をアルカリ溶解・変性したのち、Phi29 DNA polymerase で約1千万倍に全ゲノム増幅し(図2)、454-GS20 パイロシーケンサーとサンガー法による配列決定を行なった。その結果、1.1 Mb の単一の環状染色体配列の再構築に成功した⁶⁾。

得られた染色体配列は761個のタンパク遺伝子をコード

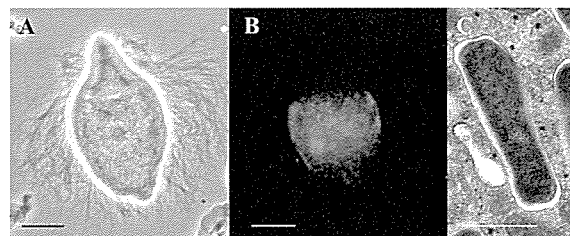


図1 原生生物 *Trichonympha agilis* と細胞内共生細菌 Rs-D17 (A) ヤマトシロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物 *Trichonympha agilis* の位相差顕微鏡像。バーは20 μm。(B) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる同原生生物細胞内に共生する Rs-D17 細菌の検出。バーは20 μm。(C) Rs-D17 細菌の透過型電顕像。バーは0.5 μm。文献6)より改変。

2010年5月20日受付・2010年6月10日受理

* Corresponding author.

E-mail: yhongoh@bio.titech.ac.jp

していたが、それに加えて、フレームシフトやナンセンス変異を含み、機能を喪失したと考えられる偽遺伝子が、121個も見出された。これは、Rs-D17細菌のゲノムが縮小進化過程にあることを示している。既知の配列との相同性から代謝系を予測したところ、Rs-D17細菌は、グルコース-6リン酸を主な炭素・エネルギー源とする、絶対嫌気性の発酵性細菌であることが明らかとなった。宿主原生生物によるセルロース分解産物であるグルコースは、豊富に宿主細胞質に存在するはずであり、またリン酸化物を取込むことで、自身のATPを節約している(図3)。

一方、窒素源については、アンモニア輸送体 AmtB とグルタミン合成酵素 GlnA の遺伝子が偽遺伝子化しており、宿主からのグルタミン供給が必須である。しかし、15種類のアミノ酸と数種のビタミン類の合成系は保持していた。このことは、細胞壁成分のリポ多糖合成系や多数の制限酵素ユニットなどの防御系、各種輸送体などの遺伝子の多くが偽遺伝子化していたことと対照的である。

シロアリは窒素分をほとんど含まない枯死材のみを餌としているため、シロアリも腸内原生生物も、餌の木材・木片から必須窒素化合物を補給できない。それらを合成し、

供給するのがRs-D17細菌だと考えられる。Rs-D17細菌では、染色体複製開始因子 DnaA の遺伝子まで偽遺伝子化しており、宿主細胞外での増殖能を既に失っている可能性が高い。つまり、Rs-D17細菌は窒素化合物合成に特化した、原生生物のオルガネラのような進化を遂げてきたと考えられる。

3. イエシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌 CfPt1-2 のゲノム解析

上記手法を用い、イエシロアリ腸内原生生物 *Pseudotriconympha grassii* の細胞内共生細菌である CfPt1-2 についても(図4)、ゲノム完全長配列取得を試み、1.1 Mb の環状染色体配列再構築に成功した⁷⁾。

CfPt1-2細菌は、分子系統学的に Bacteroidetes 門 Bacteroidales 目のシロアリ腸内由来未培養細菌クラスターに属し^{12,13)}、水素を消費すること以外は、全く機能未知であった⁹⁾。ゲノム解析の結果、Rs-D17 同様に、細胞壁合成系や制限酵素などの防御系、膜間輸送系など多くの遺伝子を消滅している一方で、19種類のアミノ酸合成系と数種のビタミン合成系を保持していた。さらに注目されるのは、空中窒素固定遺伝子群(*nif* オペロンなど)を保有していたことである。これは、Bacteroidetes 門からは初めての発見である。ニトロゲナーゼをコードする *nifH* 遺伝子の発現も、RT-PCR により確認した。また、原生生物の窒素老廃物と予想される尿素とアンモニアを取込んで再利用する系も存在した。

イエシロアリは *P. grassii* を失うと、他種の原生生物が健在でも、木片分解能力を失うことが知られており、必須の

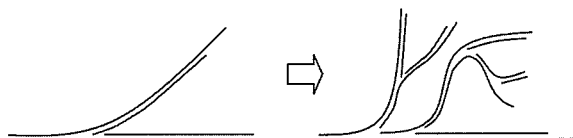


図2 Phi29 DNA polymerase による多重置換増幅
ランダムプライマーとの組み合わせにより、ゲノム全領域を多重に複製し、30℃、数時間で数千万倍以上に増幅可能。シングルセル・ゲノミクスの中核技術である。

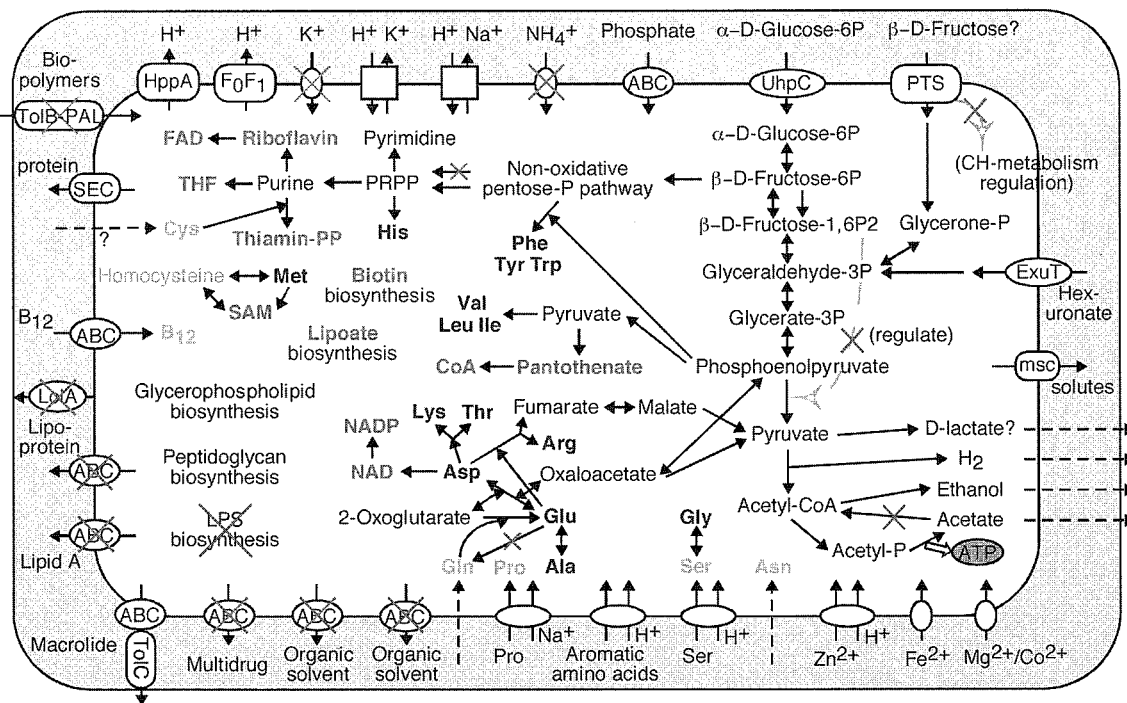


図3 原生生物 *Trichonympha agilis* の細胞内共生細菌 Rs-D17 の予想代謝図
細胞壁合成系、制限酵素、膜間輸送体など多くの遺伝子群が存在しないか偽遺伝子化(×で表示)している一方、アミノ酸とビタミン合成系は豊富に残されていた。文献6)より改変。

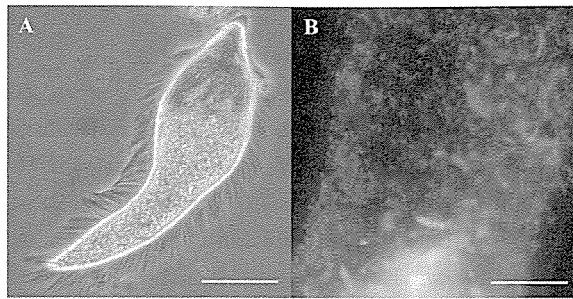


図4 原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* と細胞内共生細菌 CfPt1-2

(A) イエシロアリ腸内共生原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* の位相差観察像。同シロアリの木質分解に必須。培養不能。バーは 50 μm 。(B) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる同原生生物細胞内に共生する CfPt1-2 細菌の検出 (小粒)。本研究で “*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae*” と命名した。培養不能。バーは 10 μm 。文献 7) より改変。

共生体である¹⁷⁾。CfPt1-2 細菌は、その *P. grassii* の 1 細胞あたりに数万個も共生しており、合計で、腸内細菌細胞総数の 6~7 割をも占めている¹²⁾。それが空中からの窒素補給能力を持っていたのである。CfPt1-2 細菌の炭素源は、原生生物によるリグノセルロース分解産物のグルコース、キシロース、ウロン酸であり、解糖系によるこれらの発酵と、水素を電子供与体とするフマル酸呼吸によって ATP を生成すると予想された。これら単糖と水素は原生生物細胞内に豊富に存在するはずである。つまり、シロアリと原生生物が窒素分に乏しい枯死材を食するのに連動する形で、原生生物細胞内共生細菌が空中から窒素を補給して、アミノ酸などを合成・供給するという、極めて高度に進化した多重共生系の存在が初めて明らかになったのである (図 5)。

4. おわりに

~シングルセル・ゲノミクスを目指して~

上記のように、培養不能細菌種であっても、数百個以上の細胞があれば、ゲノム完全長配列を取得できるようになった。現在では DNA シーケンス技術がさらに進歩しているため、より少ない細胞数からでも完全長を取得できるであろう。

しかし、土壌、海洋、腸内など様々な環境中の多様な難培養微生物種のゲノムを解読するには、単一の細胞を出発点にする必要がある。そのためには、DNA コンタミネーションとゲノム DNA へのダメージを最小にするような、細菌 1 細胞単離系と、コンタミ、プライマー由来の非特異的増幅、そしてゲノム領域間の増幅バイアスを最小化した、全ゲノム増幅反応系の構築が必要である。

現在、筆者の研究室を含め、米国のスタンフォード大や J. Craig Venter Institute、マサチューセッツ工科大などいくつかの研究グループが、この「シングルセル・ゲノミクス」という新分野に挑戦している。しかし、まだ方法論は確立されていない。細胞単離を蛍光セルソーターやマイクロマニピュレーター、微細流路系などで行う手法が考案されてい

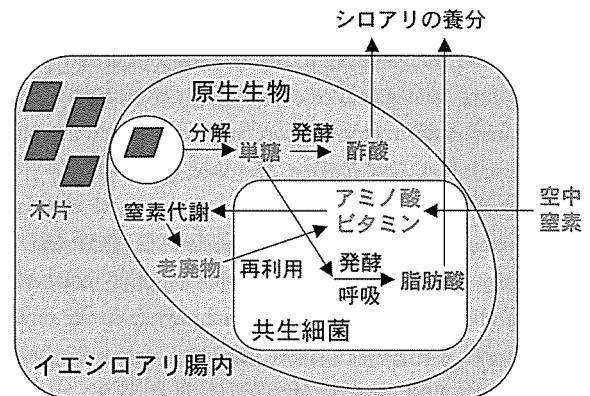


図5 イエシロアリにおけるシロアリ-原生生物-細菌の多重共生機構

るが^{10, 11, 15, 16)}、一長一短がある。いずれにしても、完全長の配列を取得するのは現実的にはかなり困難であるため、得られたゲノム断片が標的細菌種由来かを証明するための、情報解析学的手法の開発も必要である。

シングルセル・ゲノミクスが確立すれば、個々の難培養微生物種の基本機能を解明でき、また遺伝子資源として応用研究に用いることもできる。メタゲノミクスで群集全体を俯瞰し、シングルセル・ゲノミクスで個々の構成種の詳細な研究が可能となれば、我々の微生物生態系への理解は飛躍的に高まり、これまで利用困難であった難培養微生物種の産業応用への道も大きく開かれるであろう。

要 旨

環境中の大部分の微生物種は難培養性であり、それらの生理・生態は未知である。そうした難培養微生物種の機能を解明するために、少数の細胞からのゲノム完全長配列解析系の確立を試みた。標的としたのは、シロアリ腸内共生原生生物の細胞内に、さらに共生する培養不能細菌 2 種 (Rs-D17, CfPt1-2) である。各々の宿主原生生物種の 1 細胞を単離し、細胞内共生細菌を数百個漏出させて回収した。それら細菌細胞をアルカリで溶解・変性して、Phi29 DNA polymerase で等温全ゲノム増幅を行った。その結果、共に 1.1 Mb の完全長の環状染色体配列再構築に成功した。これらの全代謝系を予測したところ、宿主原生生物によるリグノセルロース分解の産物を炭素とエネルギー源とする、多様なアミノ酸やビタミン類の合成に特化した、オルガネラのような進化を遂げてきた細菌であることが判明した。特に、CfPt1-2 は空中窒素を固定する能力を持つことが初めて明らかとなった。今後は、同手法を進化させ、単一の微生物細胞から全ゲノム配列を解読する、シングルセル・ゲノミクスの確立が期待される。

引用文献

- 1) Hongoh Y, Ohkuma M and Kudo T (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 231-242

- 2) Hongoh Y, Deevong P, Inoue T, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Ohkuma M, Vongkaluang C, Noparatnaraporn N and Kudo T (2005) Intra - and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6590-6599
- 3) Hongoh Y, Deevong P, Hattori S, Inoue T, Noda S, Noparatnaraporn N, Kudo T and Ohkuma M (2006) Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6780-6788
- 4) Hongoh Y, Ekpornprasit L, Inoue T, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Ohkuma M, Noparatnaraporn N and Kudo T (2006) Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus - growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol. Ecol.*, **15**, 505-516
- 5) Hongoh Y, Sato T, Dolan MF, Noda S, Ui S, Kudo T and Ohkuma M (2007) The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the "Synergistes" group. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6270-6276
- 6) Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori M and Ohkuma M (2008) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 5555-5560
- 7) Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Toh H, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori M and Ohkuma M (2008) Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, **322**, 1108-1109
- 8) Ikeda-Ohtsubo W, Desai M, Stingl U and Brune A (2007) Phylogenetic diversity of 'Endomicrobia' and their specific affiliation with termite gut flagellates. *Microbiology*, **153**, 3458-3465
- 9) Inoue J, Saita K, Kudo T, Ui S and Ohkuma M (2007) Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of parabasalian symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell*, **6**, 1925-1932
- 10) Lasken RS (2007) Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 510-506
- 11) Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Losekann T, Ivanova N, Martin HG, Szeto E, Platt D, Hugenholtz P, Relman DA and Quake SR (2007) Dissecting biological "dark matter" with single - cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 11889-11894
- 12) Noda S, Iida T, Kitade O, Nakajima H, Kudo T and Ohkuma M (2005) Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrachonophya grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8811-8817
- 13) Noda S, Kitade O, Inoue T, Kawai M, Kanuka M, Hiroshima K, Hongoh Y, Constantino R, Uys V, Zhong J-H, Kudo T and Ohkuma M (2007) Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrachonophya* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol. Ecol.*, **16**, 1257-1266
- 14) Ohkuma M, Sato T, Noda S, Ui S, Kudo T and Hongoh Y (2007) The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **60**, 467-476
- 15) Rodrigue S, Malmstrom RR, Berlin AM, Birren BW, Henn MR and Chisholm SW (2009) Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells. *PLoS One*, **4**, e6864
- 16) Woyke T, Xie G, Copeland A, Gonzalez JM, Han C, Kiss H, Saw JH, Senin P, Yang C, Chatterji S, Cheng JF, Eisen JA, Sieracki ME and Stepanauskas R (2009) Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS ONE*, **4**, e5299
- 17) Yoshimura T (1995) Contribution of the protozoan fauna to nutritional physiology of the lower termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Wood Res.*, **82**, 68-129