

## 論文の内容の要旨

論文題目 Exploring microbial ecology using genomic information  
(ゲノム情報を用いた微生物生態の探究)

氏名 平岡 聡史

細菌や古細菌を含む微生物は、地球表層のあらゆる環境に生息しており、地球全体のバイオマス生産や物質循環の根幹を担っている重要な存在である。このような微生物は、各々の生息環境に適応するように遺伝子やゲノム構造及び群集構造を変化させている。そのため、環境中の微生物の群集構造やゲノム上の特徴を明らかにし、生態学的な位置づけを把握することは、地球全体の生態系を理解する上で極めて重要である。

微生物の生態学的特徴を把握する上で、菌株の単離と培養から実験的に生理生態を調べることや、単離株のゲノム解析から遺伝子的特徴を解析することは有用な手段である。ところが自然環境中に生息する微生物の大半は難培養性であるため、培養ベースの研究ではごく一部の微生物種を観察しているに過ぎず、微生物生態系の全容を把握することは困難である。この問題を回避し、難培養性微生物を含む網羅的な微生物コミュニティの生態系を群集構造やゲノムレベルから詳細に明らかにする手法として、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析やショットガンメタゲノム解析が今日広く利用されている(図1)。そして、得られた大量のメタゲノムデータセットをバイオインフォマティクスにより解析することで、微生物生態の新しい特徴が次々と明らかになってきており、その成果は農業や工業、医療といった幅広い分野で応用されている。(Hiraoka *et al. Microbes. Environ.* 2016)

私は上記の背景に基づき、ゲノム情報を用いて微生物生態を明らかにする探究型の研究を行ってきた。具体的には、以下の3課題に取り組んできた。

1) 津波という環境攪乱に対する微生物の応答の調べるために、津波土壌に生息する微生物の単離培養と比較ゲノム解析、及びメタゲノム解析を行い、鉄吸収に関わる遺伝子や群集構造において津波土壌特徴的な性質を見出した。

2) 微生物の大気を介した移動の実態を調べるために、雨水中に含まれる微生物を対象に 16S rRNA 遺伝子配列のアンプリコン解析を行い、雨水中微生物の群集構造は上空大気の移動経路に関連して変化していることを示した。

3) PacBio シーケンサーを用いた水圏微生物のメタゲノム解析を行い、ゲノムアセンブリから難培養性のものを含む微生物のドラフトゲノムを作成し、DNA のメチル化を評価した。

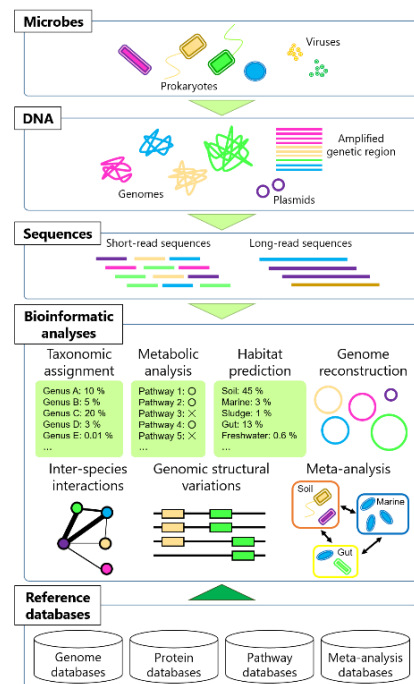


図1. 微生物のゲノム解析・メタゲノム解析の概要。

# 1. Genomic and metagenomic analysis of microbes in a soil environment affected by the 2011 Great East Japan Earthquake Tsunami

2011年3月11日、東日本の東北沖で発生した地震は、太平洋沿岸の地域に大規模な津波を引き起こした。大量の海水や海底泥が押し寄せた結果、沿岸域の土壤環境は劇的に変化し、土壤生態系に大きな影響を及ぼしたが、遺伝子・ゲノムレベルで土壤細菌叢がどのように環境変動に合わせて変化したのかは明らかではなかった。本研究では、宮城県仙台市内の海岸付近の砂地から、津波を被って一年半経過した土壤を採取し、津波土壤に適応したと考えられる細菌のゲノム決定と比較ゲノム解析を行い、津波土壤への適応に関連する遺伝子をスクリーニングした。さらに土壤成分分析とショットガンメタゲノム解析を行い、津波の影響を土壤成分と細菌組成の観点から多角的に解析した。

津波土壤に定着している微生物として複数の細菌株を単離し、計4株の*Arthrobacter*属細菌に関して454 GS FLX+やPacBio RS IIを用いたシーケンスと*de novo*ゲノムアセンブリを行った(図2)。近縁種との比較ゲノム解析から、近縁種との比較ゲノム解析から津波土壤環境に特徴的な遺伝子構造を探索したところ、単離株は鉄吸収関連化合物であるシデロフォアの合成酵素遺伝子群の欠失が見出され(図3)、培養実験から単離株の鉄吸収能力の低下が確認された。土壤分析から、津波土壤では津波を被っていない土壤と比較して高い鉄イオン濃度が観測され、整合的な結果であった。他に、津波土壤では低い硝酸濃度が観測されたが、メタゲノム解析から脱窒細菌や脱窒関連遺伝子の増加が示唆され、整合的な結果であった。さらに、津波土壤から複数の海洋性細菌が検出され、津波による微生物の生息環境の移動が示唆された。本研究は津波による環境変化に連動して土壤細菌が変化している可能性を、遺伝子・群集構造レベルで示した初の研究である。(Hiraoka *et al.* **BMG Genomics** 2016)

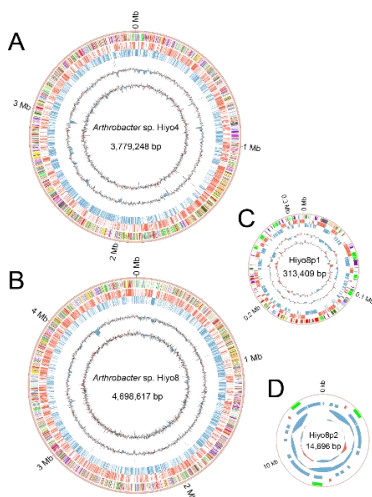


図 2. 津波土壤から単離された *Arthrobacter* 属細菌株ゲノム。

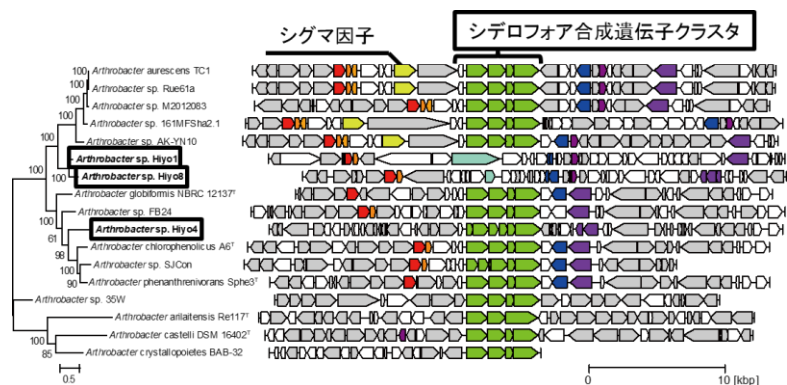


図 3. シデロフォア合成遺伝子クラスター前後のオペロン構造。枠のある株はクラスター構造が壊れている津波土壤単離株を示している。

## 2. Seasonal analysis of microbial communities in precipitation in the Greater Tokyo Area, Japan

土壌や海洋に生息する微生物は、土煙や波飛沫により大気中に巻き上げられ、風により上空を流され、雨や重力によって落下することで、海や大陸を越えて数千kmもの長距離を移動し得ると考えられている。このような微生物の長距離移動を解明する上で、雨水中の微生物の経時的な観測は重要であるが、微生物密度の低さやコンタミネーションのリスクを抑えたサンプリングの困難さのため、長期間に渡る非培養ベースの細菌叢解析は行われておらず、微生物の由来環境や気象条件との関係は十分に分かっていなかった。本研究では、低微生物密度サンプルの実験解析手法の確立と1年以上に渡る雨水回収を行い(図4)、気象データとの統合的な解析から、雨水細菌叢の多様性や気象条件との関係性の解析、及び微生物の由来環境の推定を行った。

雨水サンプルは2014年5月から2015年10月にかけて千葉県柏市及び東京都文京区の2箇所で開催し、計26サンプルを対象に16S rRNA遺伝子のV5-V6領域の増幅とシーケンスを行った。また、気温、風速、雨量等の気象データや、HYSPLITモデルによる降雨開始直前240時間の大気移動軌跡データを利用し、細菌叢との関係性を解析した。細菌叢解析の結果、雨水からはProteobacteriaやFirmicutes、Bacteroidetes等が検出され、病原菌を含む属も複数検出された。MetaMetaDBを用いた微生物の由来環境推定と高度2000 mの上空大気の大気移動経路を統合的に解析したところ、冬季にユーラシア大陸側から大気移動してくる場合には土壌や動物由来の細菌が多く、逆に夏季に太平洋側から大気もたらされた際は海洋由来の細菌がより多いことが示唆された(図5)。また気象条件と細菌叢の相関分析からBacteroidalesの相対存在量が地上気温と有意に逆相関することが示された。本研究は、経時的なサンプリングから、大気の大気移動経路に依存して雨水細菌叢が変化していることを示した初の研究である。(Hiraoka *et al. Front. Microbiol.* 2017)

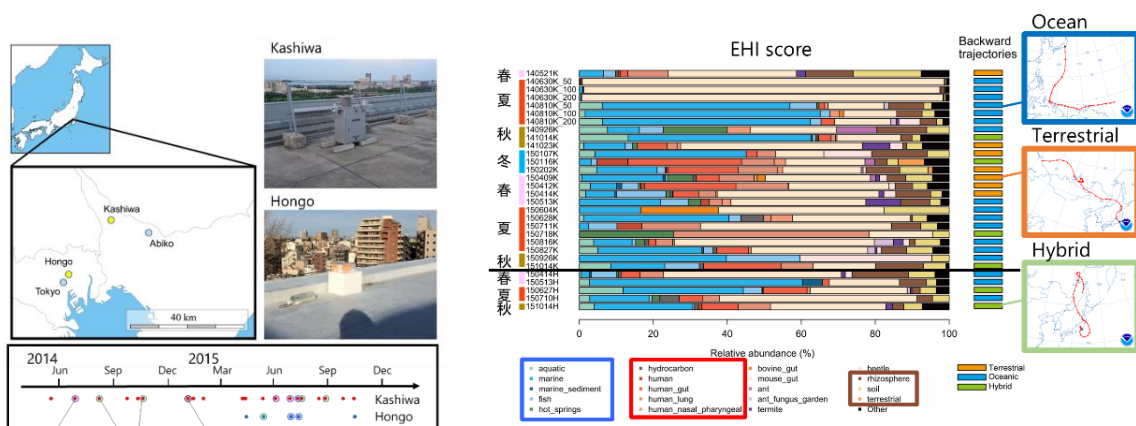


図 4. 雨水のサンプリング地点と期間。

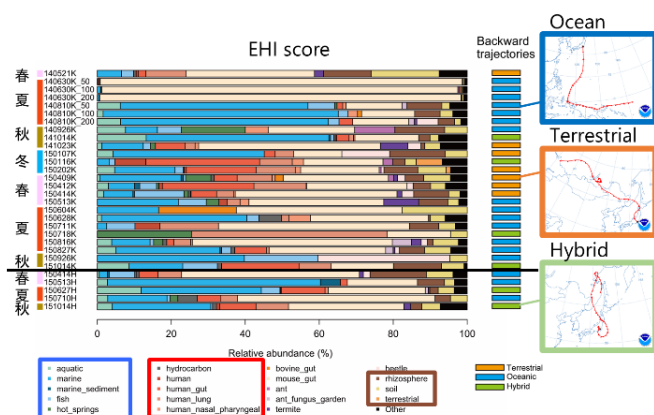


図 5. 雨水微生物の由来環境推定。左のグラフは 16S rRNA 配列を元に推定した由来環境の分布を表し、右のボックスは雨雲の移動経路を表す。

### 3. Culture-independent metagenomic and metaepigenomic analysis of prokaryotes in Lake Biwa, Japan

細菌や古細菌の多くの単離培養株において、ファージの感染に対する防衛機構として制限修飾系と呼ばれるシステムを備えており、自身の DNA をメチル化することが知られている。ところが、難培養性細菌を多く含む自然環境中の微生物群集における DNA メチル化は実験的な観測が困難なため、環境微生物制限修飾系の普遍性や多様性は十分に分かっていなかった。また、ショートリードを用いたメタゲノム解析ではアセンブリによる長いコンティグの取得が難しく、コンティグの由来菌種推定やビニングを行う上で障害となっていた。ところが近年、1 分子シーケンサー (SMRT sequencing) の登場と発展により、DNA メチル化の検出やロングリードの取得が容易になりつつある。本研究では、日本最大の湖である琵琶湖の水圏微生物に対して、ロングリードを用いたメタゲノム解析を行った。

水温躍層形成期間中の琵琶湖にて表層 5 m と深層 65 m のサンプルを採取し、4 kbp サイズのライブラリ作成と PacBio Sequel によるシーケンスを行った結果、高い塩基配列決定精度 (>97%) をもつ Circular Consensus Sequence (CCS) リードを計約 30 万本取得できた。菌叢解析からは >88% の CCS リードについて由来菌種を門レベルで推定でき (図 6)、ゲノムアセンブリからは最長 700kbp 超えるロングコンティグが得られた (図 7)。さらに、コンティグのビニングとメチル化モチーフの解析から、新規のものを含む複数のメチル化モチーフを検出し、それらのモチーフを認識するメチルトランスフェラーゼ (MTase) 遺伝子配列の組み合わせを推定できた。本研究は、メタゲノム解析に SMRT シーケンシング技術を適用し、自然環境中の細菌叢について DNA メチル化を網羅的に検証した研究である。

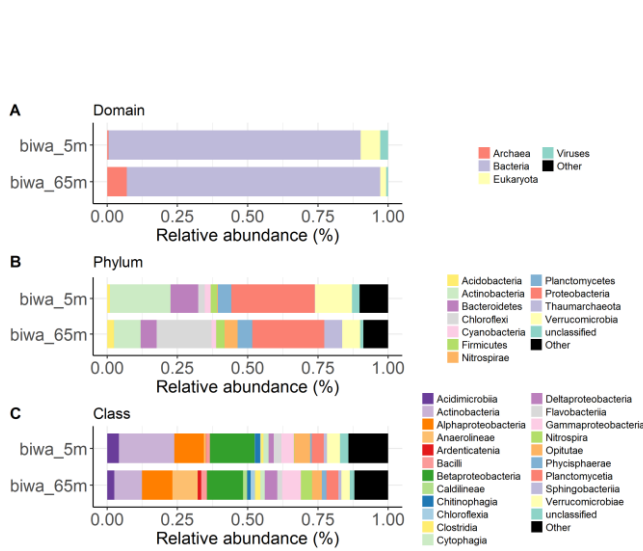


図 6. CCS リードから推定された菌叢構造。

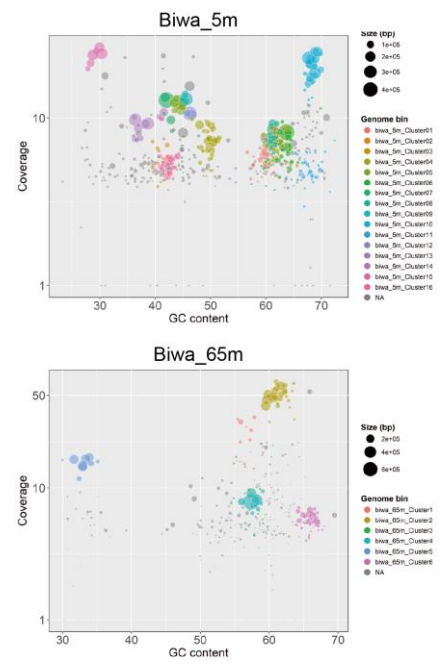


図 7. メタゲノムアセンブリから得られたコンティグ。色分けはビニングの結果を表す。