

(2) 地球温暖化により変動する水系細菌叢ゲノムの網羅的解析による評価

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

鈴木幸一・赤間 剛・石藤雄子・
森 修一・石井則久

(研究協力者)

千葉科学大学危機管理学部

藤谷 登・畑 明寿・小濱 剛

鹿児島大学水産学部

西 隆昭・山中有一

慶応義塾大学理工学部

榊原康文

鹿児島県環境保健センター水質部

宮之原陽子・尾辻裕一・長井一文・田島義徳

東京都島しょ農林水産総合センター八丈事業所

駒澤一郎

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

北河恵美子・中野琢也

鹿児島県与論町

永野博則

[要旨]

生態系の底辺を形成する細菌群は、多くの種類が集団で存在する細菌フローラを形成しており、そのバランスは環境によって大きく変動することが知られている。特に水中における細菌集団の変動は、食物連鎖の上位に存在するプランクトンや海草類に影響を与え、最終的には魚類を初めとする多くの海棲生物にまでその影響が拡大すると予想されることから、水産業や国民の食生活にも直結する問題の発端となり得る。また、温暖な地域に存在する病原性細菌が日本で検出されるかどうかを観測することは、感染症対策上極めて重要である。したがって、環境中に存在する細菌叢の変動をモニタリングすることは、温暖化が生態系全体に与える影響を最も早期に捉える鋭敏な指標としての意義が大きい。本研究では、日本各地の水系から水サンプルを採取し、そこに含まれる全DNAを抽出して、データベースにゲノム情報が登録されている全97,927種の細菌を検出するために作製したDNAマイクロアレイによって解析した。これによって、サンプル中に含まれる全細菌を網羅的に同定することが可能であるとともに、病原性細菌を同定する事も可能であった。2008年から2012年にわたって日本全国の河川、湖沼および海水から計37箇所の水を採取し、DNAを抽出して細菌DNAマイクロアレイ解析を行った。得られたアレイデータの解析により、各水域において存在する細菌群の中から、複数の水域に存在する共通性の高い菌種とともに、それぞれの水域に特徴的に存在する菌種をより高い精度で同定するとともに病原性細菌を同定した。これらの菌種を指標生物として、国内外における分布の解析と種特異的配列データの取得、プローブの量、質を向上させたアレイによるパターン解析を行うことで、温暖化、富栄養化、災害などに応答した細菌生態系変動のモニタリングに用いることが出来る可能性が示された。

[キーワード]

温暖化、水系細菌、生物種、DNAマイクロアレイ、網羅的解析

1. はじめに

水系や土壌などの地球環境中には、数多くの未同定種を含む多数の微生物が存在し、互いのバランスを保った生活圏を形成するとともに、より高等な動植物等による生態系全体の底辺を構成する。しかしながら、実験的に培養や同定できる種は僅か1%以下であり、その全体像を明らかにすることは困難であった。近年、メタゲノム解析の手法が開発されたことにより、培養操作を経ることなく、サンプル中のゲノム情報を大量に得てバイオインフォマティクス解析を行うことが可能となった。本研究では、地球温暖化の影響によって大きく変動することが予想される生活圏における水系細菌のメタゲノム解析を行い、温暖化と細菌フローラの相関を解明し、人類に及ぼす影響を予測することを目的とする。

2. 研究の背景と目的

地球温暖化をはじめとする地球規模で起こる気候変動・環境変化の問題について、気温や海面水位といったマクロな視点の指標測定がなされている。それらの結果から、気温および海面水位の上昇を伴う今後の温暖化進行シナリオが予測されており、気候変動モデルとして、より破壊力の強い熱帯低気圧の増加、水循環の変動、海洋生産性の減少、様々な生物の絶滅、感染症の分布拡大などが推測されている。一方で、気候変動が実際の生命・生態系に及ぼす影響については、現在多方面で実証が試みられているものの、未だ明確な指標は得られていない。従って、本研究では、温暖化が生態系に与える影響を早期に反映する指標として、水系細菌叢の変化を網羅的にモニタリングすることの有用性について検討を行うことを目的とする。

地球環境中には、数多くの未同定種を含む多数の微生物が存在し、水系や土壌中で互いのバランスを保った生活圏を形成するとともに、より高等な動植物等による生態系全体の底辺を構成する。特に、世代時間が極めて短い細菌群は、温暖化など環境の変動に極めて鋭敏に反応する指標生物 (index species) となり得る。このような細菌群は異なる種が集合する細菌叢としてそれぞれの環境でバランスを保ちながら存在しており、そのバランスの構成要素は環境の変化によって大きく変動することが知られている。従って、そのような細菌集団の全体像や個々の菌種の存在比を同定することで、地球温暖化の鋭敏な指標となるものと考えられる。食物連鎖の底辺にある細菌群の変動は、最終的に魚類など水産資源に影響を及ぼす。また、熱帯・亜熱帯地域沿岸の海水に存在すると言われている病原性細菌が日本沿岸で検出されるかどうか極めて興味を持たれる。

培養によって同定できる細菌種は全菌種中の僅か1%以下であると言われており、これまでは環境中に存在するような細菌集団の全体像を明らかにすることは技術的に困難であった。それを解析する手法として、初めにメタゲノム解析が行われた。メタゲノム解析の最初の報告はサルガッソー海の海洋微生物に関して行われた¹⁾。この研究では採集したサンプルに含まれる16S rRNAをPCRで増幅し、同海域に生息する微生物の内訳を推定した。また、Huber等は太平洋北東の海底1,520 mにある活火山周辺の2ヶ所から採集したサンプルについて、次世代シーケンサーを用いた海洋メタゲノム研究を行った²⁾。この2地点の距離は3 km以下と非常に近いが、サンプルの化学的な性質や外観は大きく異なっていた。16S rRNAのV6超可変領域の単位複製配列の解析によるメタゲノム解析を行ったところ、この2つのサンプルが含む菌種組成に有意な差が存在することが明らかとなった。しかしながら、Huberらの研究では真性細菌について十分なデータが含まれ

ていないなど信頼性に問題があった。また、従来の海洋メタゲノム研究一般についても、細菌叢の組成や代謝活性などの信頼できるデータが不足していることが指摘されている。したがって、海洋微生物生態系に対する気候変動の影響を議論するには、菌種組成に関する信頼性の高い定量的データ測定技術が必要である。

近年、多くの細菌のゲノムDNA塩基配列のデータベースが整備され、またDNAマイクロアレイの技術が進歩し、多数のプローブを搭載したアレイ解析が実用的な価格で可能となり、さらに極微量のDNAを増幅するwhole genome amplification (WGA)などの技術が確立された。これらの進歩により、培養という煩雑で多数の菌種の同定には不向きな操作を経ることなく、サンプル中のゲノム情報を大量に得てバイオインフォマティクス解析を行うことが可能となった。我々の研究は、そのような技術的進歩を取り入れて、これまでに無い手法を用いて地球温暖化のモニタリングに応用する可能性を検討し、その応用を目指すものである。

本研究では、日本各地の水系から採取したDNAサンプルを用いてアレイ解析を行うことで、存在する細菌叢の全体像を明らかにする。さらに、サンプル間で細菌叢の構成が共通する点及び相違する点を見出し、採取地、水温、海流と細菌叢の相関を検討する。

3. 研究方法

(1) 研究方法の概略

全国各地の水系から表層水を採取し、0.22ミクロンのフィルターに通し、フィルターから全DNAを抽出する。得られたDNAサンプルをランダムに切断し、両端にアダプター配列を付加してDNAライブラリーを作製し、アダプター特異的プライマーでPCR増幅することで全ゲノムを均一に増幅する。細菌DNAを同定用のDNAマイクロアレイの設計のために、DDBJ 16S rRNA DB (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)の登録配列情報を元にNimbleGenのプローブ設計方法に基づいて設計を行い、ArrayScribe (NimbleGen) によりアレイ上に配置する。

さらに、実際に採取した水サンプルから上記方法で精製・増幅したDNAを標識してマイクロアレイ解析に供する。日本各地で採取した水サンプルの解析を行い、細菌集団の地域特異性を明らかにし、今後の経年的モニタリングの基礎とする。

(2) DNAマイクロアレイの設計とデータの取得

マイクロアレイとは、サンプル中に存在する核酸転写産物（標的：target）の量を固体表面に固定した相補分子（プローブ：probe）によって測定する技術である。得られたDNAサンプルをランダムに切断し、両端にアダプター配列を付加してDNAライブラリーを作製し、アダプター特異的プライマーでPCR増幅することで全ゲノムを均一に増幅することが可能であることを確認した。一方で、細菌DNAを同定するためのマイクロアレイの設計を行った。すなわち、ターゲットに対するプローブはDDBJ 16S rRNA DB(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)の登録配列情報を元に抽出した真正細菌・古細菌の16S rRNA 可変領域の配列を標的にNimbleGenのプローブ設計方法に基づいて設計を行い、ArrayScribe (NimbleGen) によりアレイ上に配置を行った。その結果、全97,927標的に長さ29ntの複数のプローブを合計203,492個設計することができ、各種コントロール配列と共にアレイに搭載した。このマイクロアレイは、1つのアレイ上で2セットのデータが取得できるように設計された。この1セットを以後BLOCKと呼ぶ。プローブの総本数は723,014本、菌種のプローブ

は258,697本×BLOCK数(=2)、コントロール配列は760本×BLOCK数(=2)、さらにランダムに塩基を並べたランダム配列は205,000本となった。本研究で用いたマイクロアレイは、採集場所サンプルから約64,000種の菌種の存在を検査できる設計となった。

測定方式としては単色蛍光スポット型プラットフォームを用い、1つのアレイで1種類のみサンプルを解析した。蛍光シグナルは20回の測定値の平均によって得られ、さらにプローブがスポットされていない部分でバックグラウンドノイズを測定する。しかし、マイクロアレイではバックグラウンドの補正の他にも非特異的シグナルの検出や確率的な誤差を生ずるため、それらに対応した正規化や陽性シグナルの判定を行う必要がある。本マイクロアレイは単色法であり、サンプル間で菌数とその構成が大きく異なることが予想されるといった性質があるために、一般的に用いられているRobust Multichip Array (RMA)法やQuantile法、Lowess法といった正規化手法を行うことができない。従って、シグナル値を対数値に変換した後で陰性シグナルの99%が平均値+3SD以内のシグナル値に正規分布することから、平均値+3SDを閾値としてそれ以上のシグナル値を有するプローブを陽性として解析を行った。

(3) データ解析

マイクロアレイの解析対象である約64,000種の中からいずれか1つのサンプルで陽性だった菌種に限定して解析を行った。細菌叢の構成を明らかにするために、分類学上の門レベルで陽性細菌及び古細菌を分類し、構成比を検討した。また全サンプルのシグナル検出パターンが類似する陽性細菌/古細菌をクラスターにまとめるクラスタリング解析をCluster 3.0によって行い、TreeView 1.0によって樹形図として描画した。

(4) 実験材料

サンプルを採取し一括して解析を行った地点は、稚内市（北海道）、根室市花咲港（北海道）、山田町（岩手）、大槌町（岩手）、利根川（銚子市かもめ大橋、千葉）、松江市加賀（島根）、鳴門市（徳島）、三波町（徳島）、八丈島（東京）、池田湖（鹿児島）、与論港（鹿児島）、古宇利島（沖縄）、南城市（沖縄）の13箇所である（図1）。

南北1500kmにわたり中緯度に位置する日本では、四季による気候の変動が激しく、水温は20度以上変動する。また、日本列島は南北からの海流にさらされており、黒潮はフィリピン近海から日本列島の太平洋側を利根川沖まで、あるいは対馬海流として日本海側にも流れ込んでいる。一方、親潮は北海道東岸を南下し利根川沖に到達する。オホーツク海流と合わせて、これらの海流は季節ごとに流路、流速を変動させ、日本近海で交じり合う。従って、日本近海の細菌叢はこれら気候、海流、陸上生態系全ての影響を受けて形成されることが考えられる。そこで、稚内市から南城市に至る南北にわたる各地で経年的にサンプルを取得し、また、日本海側の島根県加賀や、東北地方太平洋沖地震の際に10メートル以上の津波が到達し4か月が経過した岩手県山田町及び大槌町でもサンプルの採集を行った。採集の際には、場所、日時、採取量、水温、pH およびDNA収量を記録した。



図1 2008年から2012年までのサンプリング箇所

4. 結果・考察

2008年からの4年間に国内13地点で採取した37種類のサンプルを一括して解析に用いた。平均値+3SD以上のシグナル値を有するプローブ由来のデータを、サンプル間でのマイクロアレイシグナル強度のパターンが類似した菌種をクラスターにまとめるために、クラスタリング解析に供した。まず、同一採集地点由来のサンプルをまとめて解析した(利根川採集サンプルの例を図2に示す)。

縦方向にいずれかのサンプルで陽性だった細菌/古細菌をシグナル値のパターン類似性に基づいて並べて樹形図によってクラスターを表現し、横方向にサンプル間の類似性に基づいて樹形図を描いた。上部の樹形図で示されたサンプル間の類似性については採集年が近いサンプル間で類似性が高い妥当な結果となった。2010年のサンプルで潮の干満の影響を見ると、干潮時と満潮時で異なるシグナルを示すクラスターが存在する一方、全体として他の採集年のサンプルより高い類似性を示した。

同一採集地点に由来するサンプルからは、日本全国の普遍種と地域固有の普遍種の安定した検出が期待されるが、一方で、気候などその時々々の環境に応じて細菌叢は変化すると考えられるため、一部のサンプルで検出される細菌も存在する。図2において、上部のクラスターを除き大半の菌種が大きく変動することが明らかとなった。このような傾向は稚内、根室、八丈島、池田湖、与論島の各地で採集したサンプルを解析した際にも同様の傾向となった。

そこで安定的に検出される日本全国の普遍種と地域固有の普遍種を見出すために、図2のような同一採集地点あるいは同一採集年のサンプルに限定したクラスタリングを行い、サンプル間で

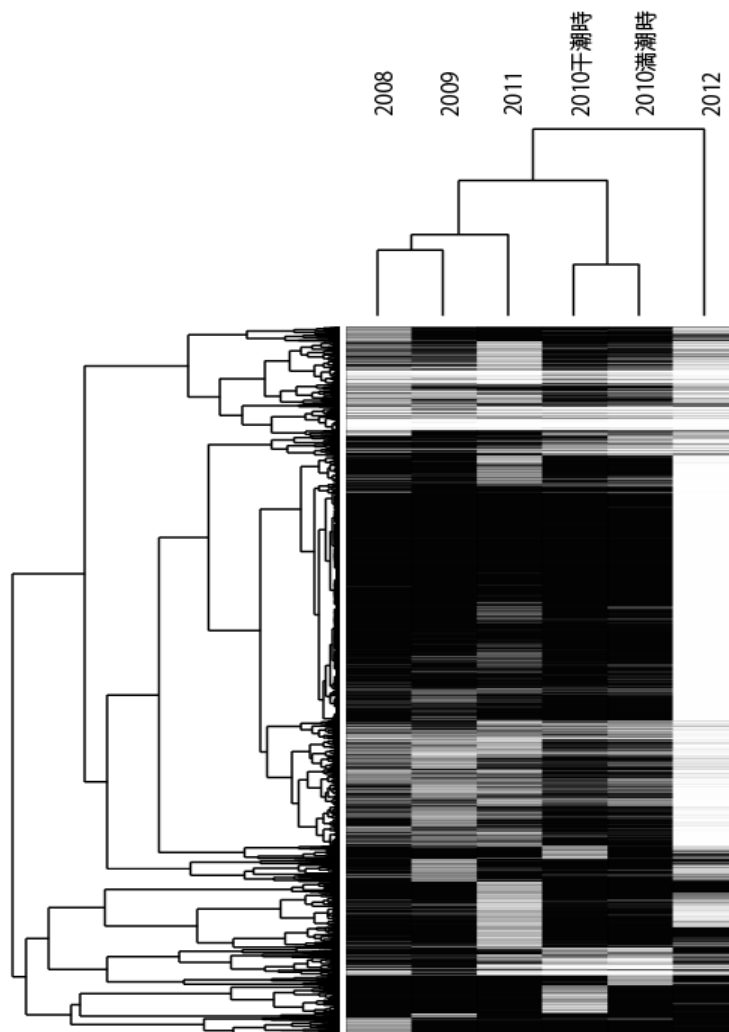


図2 利根川採集サンプルに限定したクラスタリング

安定的にシグナルが検出されたクラスターのみを抽出し、一部のサンプルでのみ検出される菌種を排除した。その後、まず全サンプル間の類似性を検討するためにクラスタリングを行った(図3)。

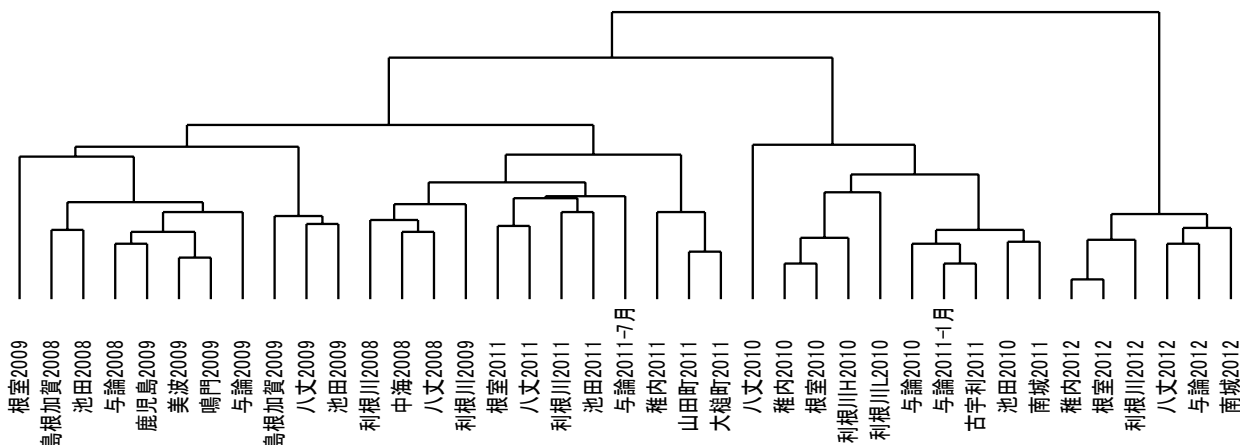


図3 全サンプル間のクラスタリング

その結果、採集地点よりも採集時期に応じた類似性を示すことが明らかとなった。この類似性

の傾向は、同一の細菌種を門ごとに分類し組成を検討した結果においても観察された（図4）。

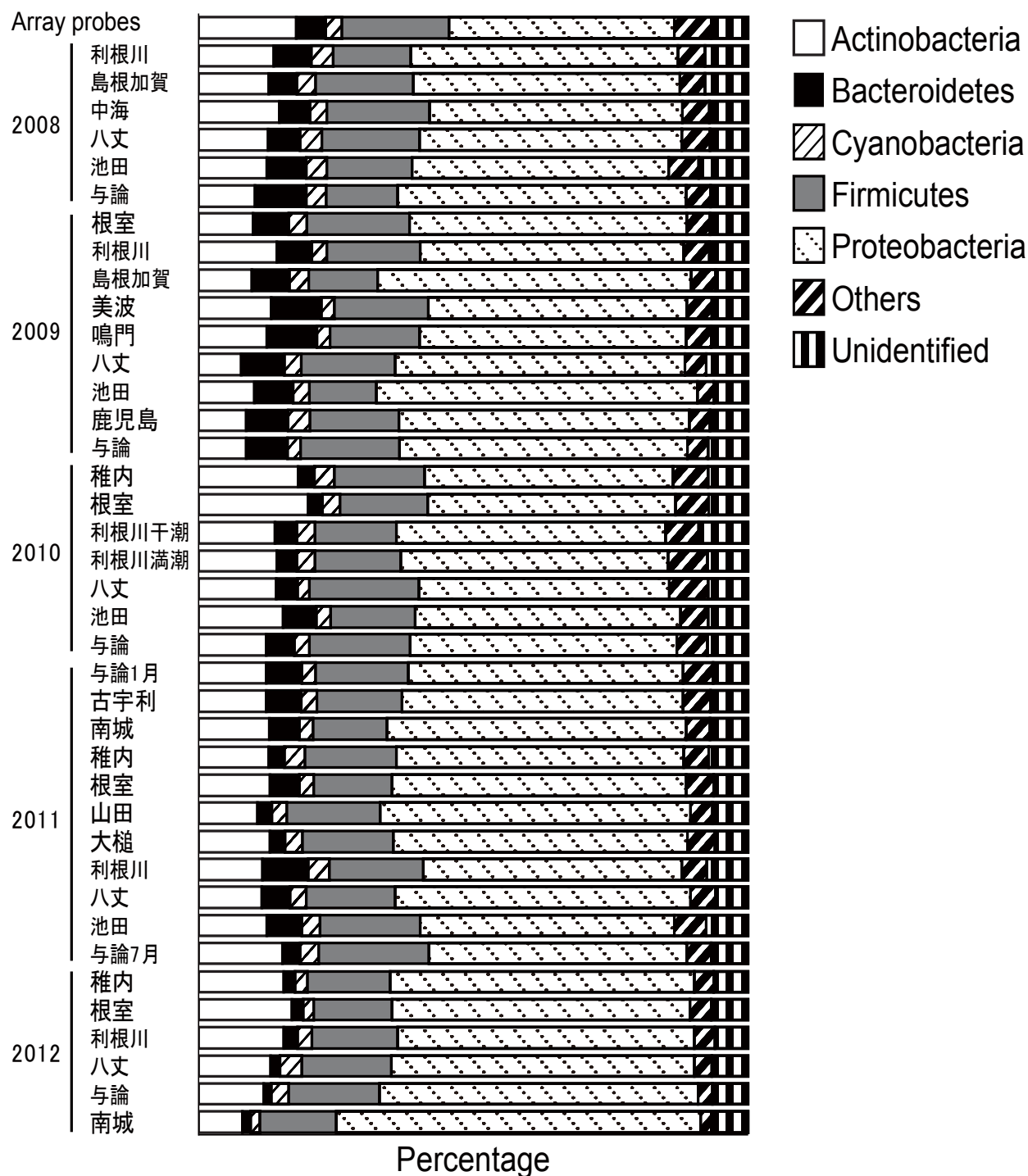


図4 細菌を門レベルで分類した時におけるアレイチップ上のプローブ分類組成と各サンプルでの検出分類組成

次に地域固有種を見出すために、全サンプルを用いてクラスタリングを行った。サンプルについてクラスタリングは行わず、採集地ごとに整列させた(図5)。

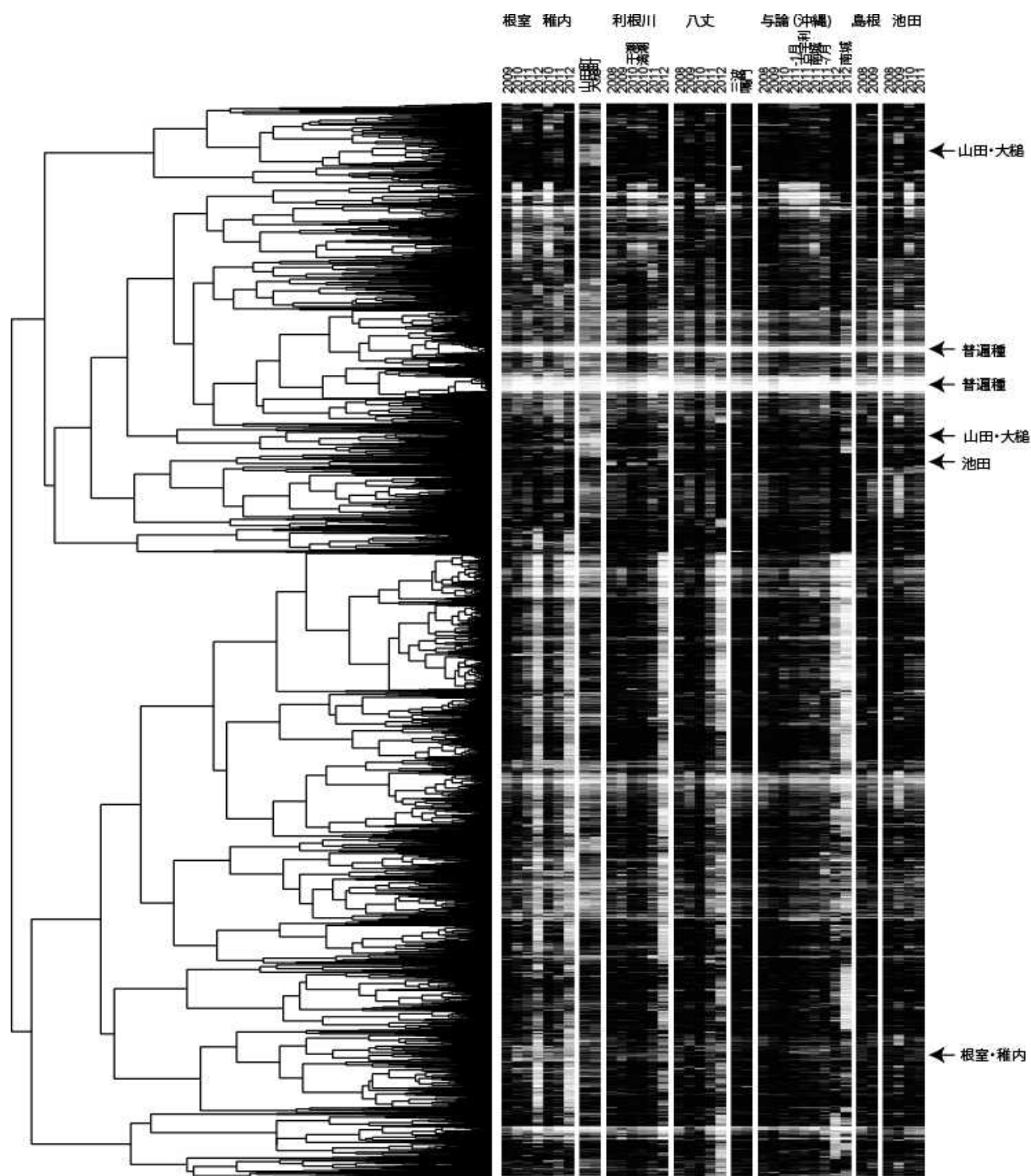


図5 全サンプルを用いた菌種間のクラスタリング

菌種間のクラスターは、まず上部と下部の2つに大別される結果となったが、これは2012年のシグナルパターンに影響を受けていると考えられる。特に顕著なクラスターとして、全サンプルで強いシグナルを持つクラスターが2か所存在した。尚、一つのクラスターに集約されていないのは、

これら2群間でシグナルのパターンが若干異なっているためである。より大きいクラスターの構成菌種を図6に示す。

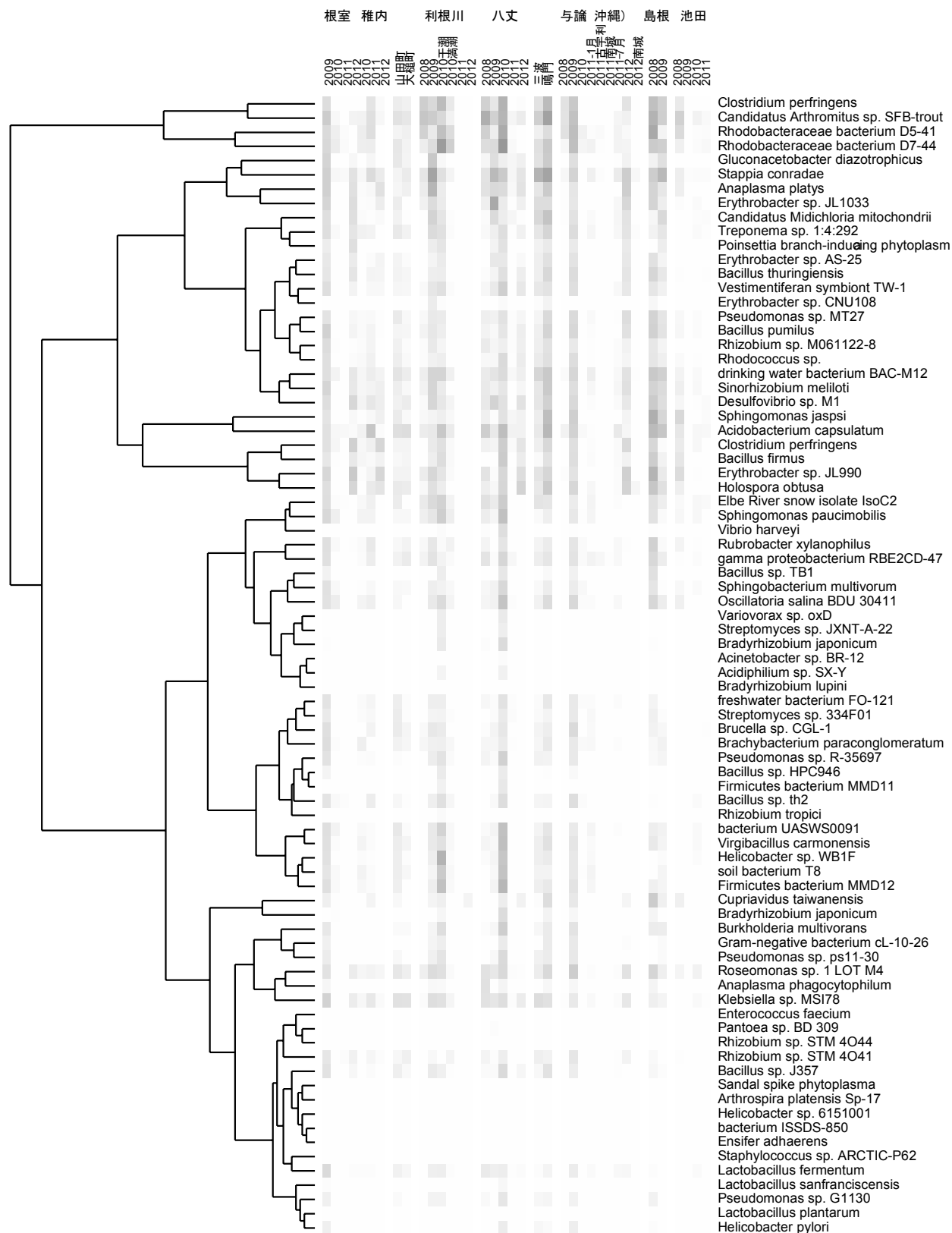


図6 日本普遍種のクラスター

日本普遍種のクラスターの次に明確なクラスターを形成していたのは、山田町・大槌町特異的クラスターだった。2か所見出されたクラスターのうち、特に強いシグナルを持つクラスターの構成菌種を図7に示す。

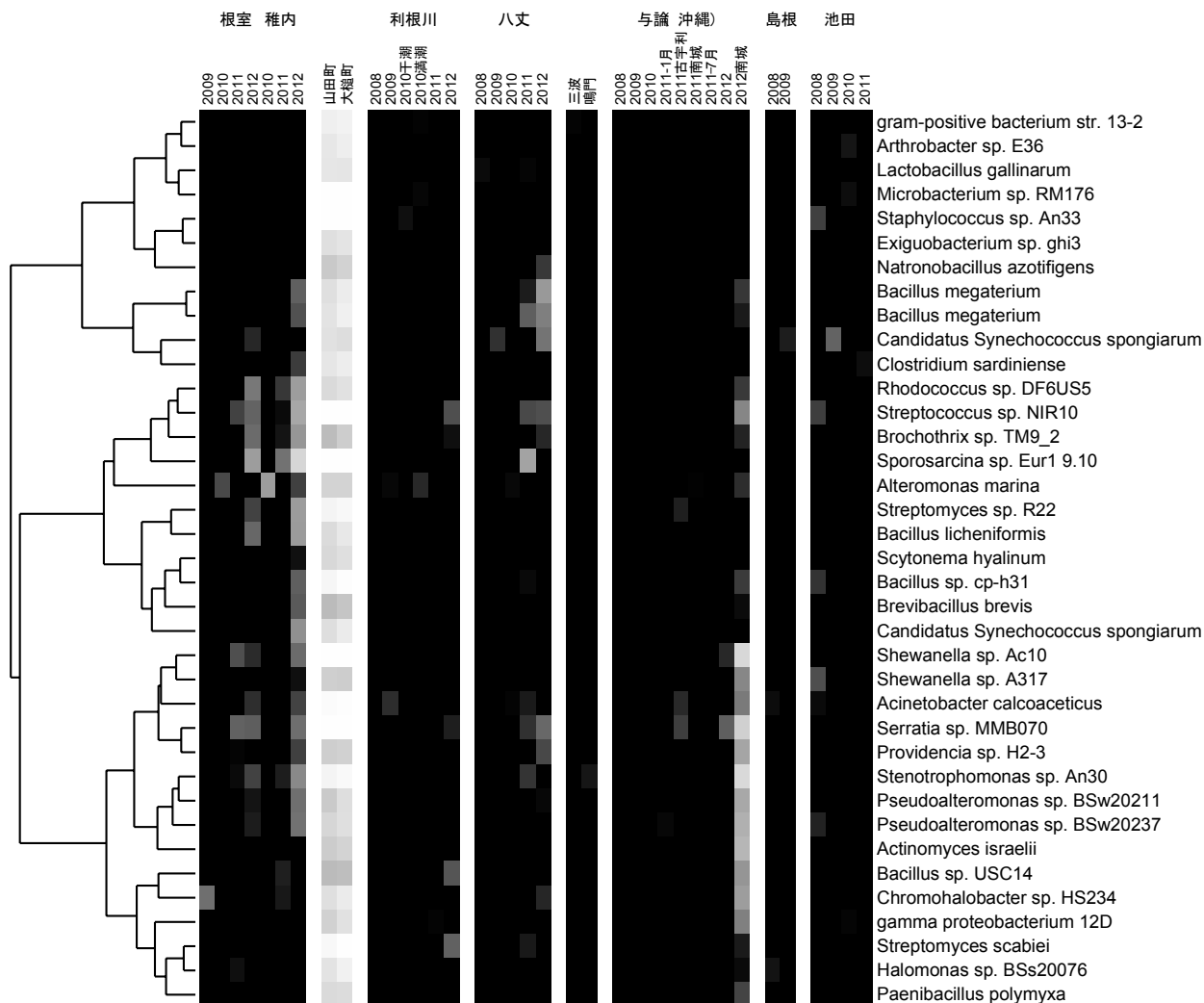


図7 山田町・大槌町サンプル固有の細菌種クラスター

このクラスターからは、海洋で単離された細菌種の他に、*Bacillus licheniformis*、*Scytonema hyalinum*、*Brevibacillus brevis*、*Streptomyces scabiei*といった窒素固定菌などの土壌菌が数多く含まれている。津波の影響で大量の土砂が海に流出した影響が細菌叢にも表れていることを示唆している。また、山田町・大槌町固有クラスターに隣接して池田湖で相対的にシグナルが強いクラスターも存在した。山田町・大槌町と池田湖の類似性はいずれも土壌の細菌叢の影響を受けている可能性を示唆している。

一方、北方や南方の採集地点に限定したシグナルを持つクラスターは明確には表れなかった。図5に示したように、根室と稚内で比較的シグナルが強いクラスターは存在したが利根川由来サンプルでも検出されていた。これは潮流によって細菌が移動し、かつマイクロアレイでは生菌と死菌を区別できないことが影響していると考えられる。これまでの報告において北方特異的細菌や

南方特異的細菌をいくつか選択してきたが、それらは特にシグナルの強い地域特異的優先種として見出されており、クラスタリング以外の解析法の有効性を示唆している。

さらに、2009年度に採取したサンプルを用いて病原性細菌がどの程度検出されるかについて検討を行った。病原細菌データベース (<http://bac.hs.med.kyoto-u.ac.jp/alphabet-j.html>)、および人病原細菌定量解析菌名リスト (http://www.ecotest.jp/analysis/microorganism/documents/human_pathogenic_bacteria_list.pdf) に収載されている細菌DNAが今回行ったDNAマイクロアレイで、バックグラウンドより高いレベルで検出されたと判断されたものをリストアップした(表1)。ただし、これはDNAマイクロアレイによるDNAレベルでの検出結果であり、これらの細菌が感染力を持った状態で存在する事を示すものではないことに注意を要する。また、環境中に存在する細菌の99%以上はそのゲノム情報が得られていないと考えられていることから、それら未同定の細菌DNAがアレイ上に搭載した病原細菌DNA塩基配列と相同性があることにより、DNAマイクロアレイ解析上、同定されたという見せかけの結果になった可能性も考えられる。したがって、DNAマイクロアレイで検出された個々の菌種に関して、その真の存在の有無が問題になる場合はPCR法や培養法による確認が必要である。何れにしても、これら病原性細菌のモニタリングも重要であることは言うまでもない。

表1 DNAマイクロアレイによって検出された病原細菌*

Species	根室	銚子	加賀	美波	鳴門	八丈	池田	鹿児島	与論
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus anthracis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Leptospira interrogans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>Salmonella</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	-

<i>typhimurium</i>									
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	-

*DNAマイクロアレイで発現が見られたものを(+)、無かったものを(-)で示した。この結果は、DNAマイクロアレイによるものであり、実際に感染力を持った細菌の存在を意味するものではないことに注意が必要である。

5. 本研究により得られた成果

従来、メタゲノム解析は莫大なコストや時間を要したが、我々が確立したDNAマイクロアレイ解析により、実用的なコストで、これまでにゲノム情報がデータベースに登録されているほとんど全ての細菌の存在情報を明らかにすることが出来た。実際に、本研究の結果特定した地域特異的のクラスターには、いずれも大量の菌種未同定なプローブが含まれており、従来の細菌学的な手法では解析し得なかった細菌を数多く解析対象とすることができた。

本研究により、環境水中の細菌集団全体のモニタリングが可能となり、日本近海の普遍種、各地域の固有種、季節を反映する種、病原性を有する種、津波による環境変化を反映する種など、多様な情報を取得することが出来た。すなわち、DNAマイクロアレイによる細菌叢の変動解析手法は、様々な環境を反映する手法として有用であることが示された。今後さらに判定精度を改善するために、16S rRNA以外の種同定マーカー遺伝子配列の利用を検討することができる。

これらの情報を活用することで、温暖化のみならず様々な環境変化を反映する生物指標を得ることが可能となる。水系細菌を対象としたこれらの研究をさらに進めることにより、温暖化などの全球的気候変動だけでなく、大規模災害などの細菌叢変動要因が海洋生態系を通じて漁業などの産業に与える影響を早期に定量的に観測する手法の確立につながることを示された。

一方で、大量のデータが得られることから、温暖化、種多様性を取り巻く細菌叢といったデータの評価項目の策定とその簡便な解析方法の確立が今後の課題となろう。特に、DNAマイクロアレイによるDNA検出データから実際の菌を生物学的に同定したり、未同定細菌をそれ以上解析することは困難であり、あくまでアレイ解析による網羅的データであることに留意する必要がある。

本研究の結果を受けて、今後、特定の指標生物に特化して、より迅速かつ安価な解析方法を確立すれば、さらに簡便な解析手法として広く普及させることが可能であると期待される。本研究によって、そのような細菌叢変動評価系の確立への基礎を築くことができた。さらに、今後同様の手法を用いることにより、水中だけでなく、土壌や人間の生活環境においても指標細菌を同定し、細菌叢変動のモニタリングに用いることも可能と考えられた。

6. 引用文献

- 1) Giovannoni, S.J., Britschagi, T.B., et al., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345(6270): 60-63.
- 2) Huber, J.A., Mark Welch, D.B., et al., 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*, 318(5847): 97-100.

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表 (学術誌)

- ① T. Akama, K. Tanigawa, K. Nakamura, A. Kawashima, H. Wu, M. Sue, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii and K. Suzuki. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, (2011).
“Whole Genome Tiling Array Analysis of Bacterial Genome. In: Campbell MJ (Eds): DNA Microarrays, Synthesis and Synthetic DNA.”

(2) 口頭発表

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

なし