

# 微生物間のネットワーク解析による宍道湖に生息する微生物の相関説明 報告書

松江工業高等専門学校 山口 剛士

## 1. はじめに

環境中に生息する微生物は、さまざまな代謝を有しており、水環境においても水質改善や栄養塩除去に大いに寄与している。それら微生物を特定する方法として、微生物が有する塩基配列情報に基づいた手法が主要であり、またこの手法で最も広く利用されているのがリボソームRNA(rRNA)遺伝子の塩基配列である<sup>1)</sup>。近年報告されているDNAシーケンサは、ロッシュ・ダイアグノスティクス社の454をはじめ、イルミナ社のGenome Analyzer、ライフテクノロジーズ社のSOLIDなど多くの次世代シーケンサ<sup>2)</sup>があり、これらは非常に膨大な量の塩基配列を高速に読み取ることが可能である。例えば、1回の解析においてサンプル中に存在している1万以上の塩基配列を得ることができる<sup>3)</sup>。故に、1つサンプル中に生息する1万以上の微生物を把握することが可能となった。DNAシーケンサの発展により、膨大な塩基配列データを収集することで地球上に生息する99%が未培養微生物であることが明らかとなった。しかし、rRNA遺伝子の類似性が97%以下となる配列が得られたときは、新種である可能性が高く微生物機能が未知の場合がある。微生物機能や代謝経路を把握するためには、今日においても分離培養が有用な方法として報告されている。近年では、微生物間の微生物相互作用を用いた新規単離培養手法の報告もされており、自然界における共生関係による生物、植物のように、微生物においても例外ではないことが明らかとなっている。例えば、微生物の代表的な報告として硫酸還元菌とメタン生成菌が挙げられる<sup>4)</sup>。微生物相互作用を用いた培養手法は、共生関係にある微生物の存在を確認したという前提で成り立っている。近年の次世代シーケンサの発展により、膨大なゲノム情報から微生物間の相互作用を網羅的に解析でき、複雑な微生物間の相互関係や相互作用ネットワークを解析できるようになった<sup>5)</sup>。その結果、環境中に生息する微生物が変遷する際に、共生関係にある微生物群や相関がある微生物群を明らかにすることができる。

本研究では、各年で多くの未培養微生物が生息している宍道湖を対象として、未培養微生物を分離培養するために必要な共生関係にある微生物を把握することを目的として、微生物相互作用ネットワーク解析により、宍道湖に生息する未培養微生物間において共生関係の微生物が生息しているのか調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 微生物群集構造解析

まず、各年で行っていた微生物群集構造解析を組み合わせるために、各データを整理し、宍道湖の各地点 (Fig. 1) における2年間分の微生物群集構造解析を行った。なお、年間を通していずれかが3%以上のde novoのみを扱った。宍道湖に生息する微生物から得られた塩基配列は、近縁種検索ツールであるQIIME<sup>6)</sup>及びBlast tool (NCBI: National Center for Biotechnology Information の提供)を用いて、近縁種の推定を行った。



Fig.1 宍道湖における採水地点

### 2.2 微生物相互作用ネットワーク解析

微生物相互作用ネットワーク解析では、QIIME2で作成したOUT (operational taxonomic unit) を整理し、統計ソフトであるPast3を用いて相関係数を求めた。さらに、強い相関 ( $rs > 0.5$ ,  $rs < -0.5$ ) かつ、優位水準 ( $p = 0.01$ ) に満たないデータを省いた。次に、ネットワーク図作成ソフトであるCytoscape\_3.7.2 softwareを用いて分子間相互作用のネットワークを可視化した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 各地点で形成する微生物叢で相関が高い未培養微生物によるネットワーク解析

微生物群集構造解析より得られた未培養微生物の塩基配列を用いて、各地点で形成する微生物叢のネットワーク解析を行った。微生物群集構造解析を行った結果、優占していない微生物の中にも多くの未培養微生物が存在していた。宍道湖湖心における強い相関を示した微生物叢を Fig.2 に示す。また、Fig.2 の中で亜硝酸還元を行っている可能性がある微生物だけの相関図を Fig. 3 に示す。その結果、*Solimonas terrae*, *Conexibacter arvalis* に近縁な微生物など、硝酸塩を亜硝酸塩に還元する微生物に正の相関がみられ、複数の微生物が共生し亜硝酸還元を行っていることが示唆された。また、好気性細菌である *Brevibacillus* 属及び *Acidovorax* 属に属する微生物の両者には正の相関であり、共存していることが示唆された(データ非表示)。また、塩分濃度が高かった S5b 地点では、海洋性細菌が豊富に存在しており、*Candidatus Actinomarina*, *Actinomycetales* 科, *AEGEAN-169 marine group*, *SAR11 clade I a*, *SAR86* に属する未培養微生物に正の相関がみられた (Fig. 4)。これらの海洋微生物が増加した要因としては、その地点が海水環境に近いことが考えられる。また、各地点のネットワーク図を Fig. 5 に示す。これらの結果から、宍道湖の微生物の変遷は、微生物群集構造解析によって明らかにされてきたが、ネットワーク解析により相互関係の複雑さや環境要因による依存性を明確に表すことができた。

### 3.2 全地点で全期間を通して優占していた微生物

次に、宍道湖全域において優占している微生物群について解析を行った。全ての地点において最も存在割合が高いのは、*hgcl clade* に属する微生物であった。この微生物の近縁種は、広範囲の淡水生息地で一般的かつ豊富に存在していることが報告されている<sup>9)</sup>。また、*hgcl clade* に属する微生物は、*Demequina lutea* と近縁であり、その微生物は、微生物活性が低下するが、嫌気性条件で 2% (w/v) NaCl 濃度以下であれば亜硝酸塩から硝酸塩へ還元することが可能であると報告されている<sup>10)</sup>。そこで、微生物の増減が環境的要因なのか他の微生物との共生関係なのか明らかにするために微生物相互ネットワーク解析を行った。S5b 地点以外では *hgcl clade* に属する微生物は、他の微生物との相関がほとんど見られなかった。一方、S5b 地点では、*hgcl clade* に属する微生物の存在割合は、他の地点よりも低かったが *Tenacibaculum sediminilitoris* 及び *Defluviimonas indica* と負の相

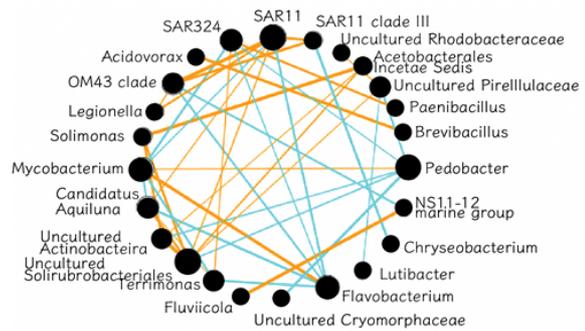


Fig. 2 Cytoscape を用いた S3 における微生物相互作用ネットワーク解析の結果。オレンジの線：正の相関，水色の線：負の相関

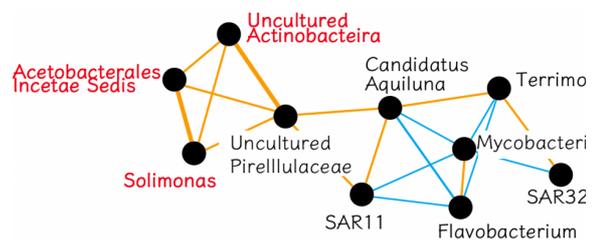


Fig. 3 S3 において亜硝酸還元を行っている微生物群

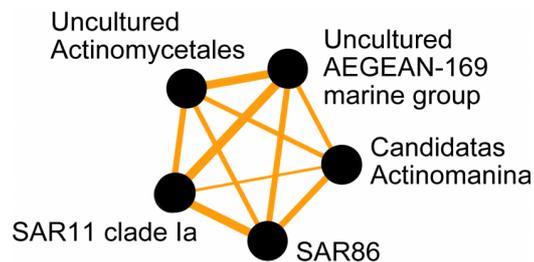


Fig.4 S5b において高い相関を示した海洋性微生物群

Table.1 *hgcl clade* と相関を持つ微生物とその相関係数

地点	相関を示した微生物群	相関係数	目的の微生物群
s5b	<i>CL500-29 marine group</i>	0.8022	<i>hgcl clade</i>
	<i>Tenacibaculum sediminilitoris</i>	-0.75834	
	<i>NS11-12 marine group III</i>	0.70702	
	<i>Defluviimonas indica</i>	-0.72275	

Table.2 *Flavobacterium* 属と相関を持つ微生物とその相関係数

地点	相関を示した微生物群	相関係数	目的の微生物群
s3	<i>SAR11</i>	-0.77723	<i>Flavobacterium</i>
	<i>SAR11 Clade III</i>	-0.8022	
	<i>Candidatus Aquiluna</i>	-0.8022	
s5t	<i>SAR11 Clade III</i>	-0.75853	

関を示した (Table.1). *Tenacibaculum sediminitoris* に属する微生物は、嫌気条件で 2.0~4.0% (w/v) NaCl 濃度で増殖し、*Defluviimonas indica* は、好気条件で 1.5~2.0% (w/v) NaCl 濃度で増殖できると報告されている<sup>11,12</sup>. 負の相関があると一方の増加に対し、もう一方の微生物が減少するため、*hgcl clade* に属する微生物は、あらゆる水環境下で単離され幅広い分布を示すことから、宍道湖の微生物叢への影響を受けていないと考えられたが、上記の微生物群と負の影響を受けていることが示唆された。

宍道湖においては淡水側の地点で優占していた微生物は、あらゆる水環境下で単離されている *Flavobacterium* 属に属する近縁種であった。この微生物は、海洋細菌の未培養微生物である *Clade III* に属するグループと *Candidatus Aquiluna* との間に負の相関を示した (Table.2). 特に、*Flavobacterium* 属の存在割合は、斐伊川流入口付近である地点で最も高かったことから、海洋性細菌の未培養微生物である *Clade III* に属する微生物と *Candidatus Aquiluna* の存在割合の減少に伴い、*Flavobacterium* 属に属する微生物が優占していたと考えられ、この3種の微生物群の相関は、宍道湖における淡水側の地点の微生物変遷に影響している可能性があると考えられた。

#### 4. まとめ

本研究により、宍道湖に生息する微生物の微生物相互作用ネットワークにより、複雑な微生物の相関を明らかにした。その結果、宍道湖の未培養微生物のいくつかの微生物群は、共生関係で存在数が増減していることが示唆された。これらの結果から、宍道湖の微生物群は、微生物相互作用を有している微生物が存在していることが明らかになった。

#### 5. 参考文献

- 1) 中村 和憲, 関口 勇地, 微生物の分類・同定, 微生物叢解析技術,15-34,2009
- 2)大島 健志郎, 服部 正平, 次世代シーケンサーを用いたゲノム解析とメタゲノム解析,難培養微生物研究の最新技術II,大熊 盛也,工藤 俊章,pp75,2010
- 3)Joshua G.Tweedy *et al.*, *Antiviral Research*, Vol. 146, 201-204, 2017.
- 4)Enoma O. Omeregie *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, 3198–3215, 2008.
- 5)加藤 恭崇, 腸内細菌学雑誌, Vol. 29, 19-22, 2015.
- 6)Marc J. Bonder *et al.*, *Bioinformatics*, Vol. 28, 2891–2897, 2012.
- 7)Liwei Sun *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.66,2635–2642,2016
- 8)Peeter Laas *et al.*, *J Marine Systems*, Vol. 129, 127-134,2014.
- 9)Warnecke F *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 6, 242–253,2014
- 10)Kai Waldemar Finster *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.59, 649– 653,2009
- 11)Sooyeon Park *et al.*,*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*,Vol.66, 2610–2616, 2016
- 12)Lijing Jiang *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.64, 2084– 2088,2014.

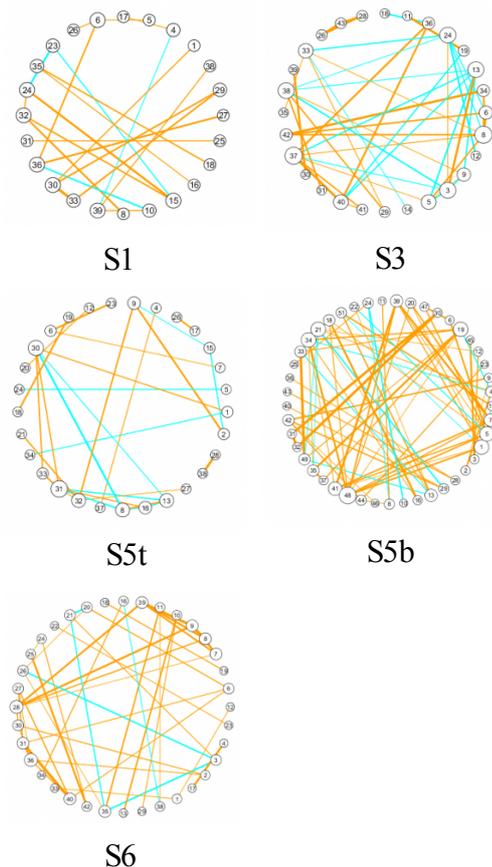


Fig. 5 各地点の相関の高い微生物によるネットワーク図

