

P-10 ナノアーキアの検出と培養株確立の試み

伊藤 隆¹・小笠原綾香^{1,2}・加藤真悟¹・雪 真弘¹・大熊盛也¹・高品知典²

¹理研バイオリソース研究センター・微生物材料開発室, ²東洋大学大学院生命科学研究科

INTRODUCTION

近年, 大きさが500 nm程度と微小で, 他のアーキアに外部共生（寄生）していると思われる多様なアーキア群（本研究ではナノアーキアと称する）が見つかってきている. このうち*Nanoarchaeota*門アーキアは, 海底熱水孔や陸上温泉から頻繁に検出されており, これらは超好熱性の*Crenarchaeota*アーキアに共生/寄生していると考えられている. これまでに2002年に海底熱水地帯から*'Nanoarchaeum equitans'* Kin4-M（宿主は*Ignicoccus hospitalis*）, 2016年にはイエローストーン国立公園の酸性温泉から*'Nanopusillus acidilobi'*（宿主は*Acidilobus* sp. strain 7A）の培養系が報告されている (1, 2). さらには*Sulfolobales*目アーキアの一種に共生/寄生していると思われる*'Nanobsidianus stetteri'*（Nst1）が単一分離され, そのゲノム解析が行われている (3). またカムチャツカの温泉にも*Nanoarchahota*が検出されており, その宿主は*Vulcanisata*属ではないかと推定されている (4).

この様に*Nanoarchaeota*は*Crenarchaota*が生存する熱水環境には普通に存在しているものと思われるが, その生態学的実態や宿主範囲, 共生（寄生）のメカニズムはよく分かっていない. 本研究では*Nanoarchaeota*を中心にその分布パターンの解明と培養株の確立を目指すことを目的とした.

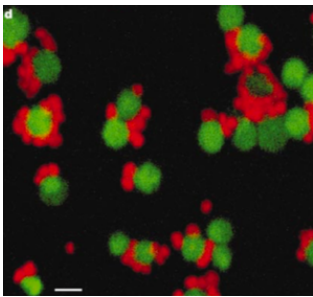


図1 培養化された*Nanoarchaeota*: *'Nanoarchaeum equitans'* (左) と *'Nanopusillus acidilobi'* (右) それぞれ文献(1)・(2)より引用.

RESULTS

表1 本研究で用いた温泉水試料

Date	Hot spring sample	Temp. (°C)	pH	DNA (mg/L)
2016/10/02	栃木県奥塩原温泉・むじなの湯-1	45?	2.1	ND
2016/11/06	秋田県玉川温泉・噴湯	85	2.4	0.49
2016/11/07	秋田県後生掛温泉・温泉細流	45	3.4	6.55
2016/11/07	秋田県蒸ノ湯温泉・温泉細流	50	3.3	6.04
2017/10/02	栃木県奥塩原温泉・むじなの湯-2	45	2.5	12.19



図2 温泉サンプリング地の様子. 左は玉川温泉, 右は奥塩原温泉・むじなの湯.

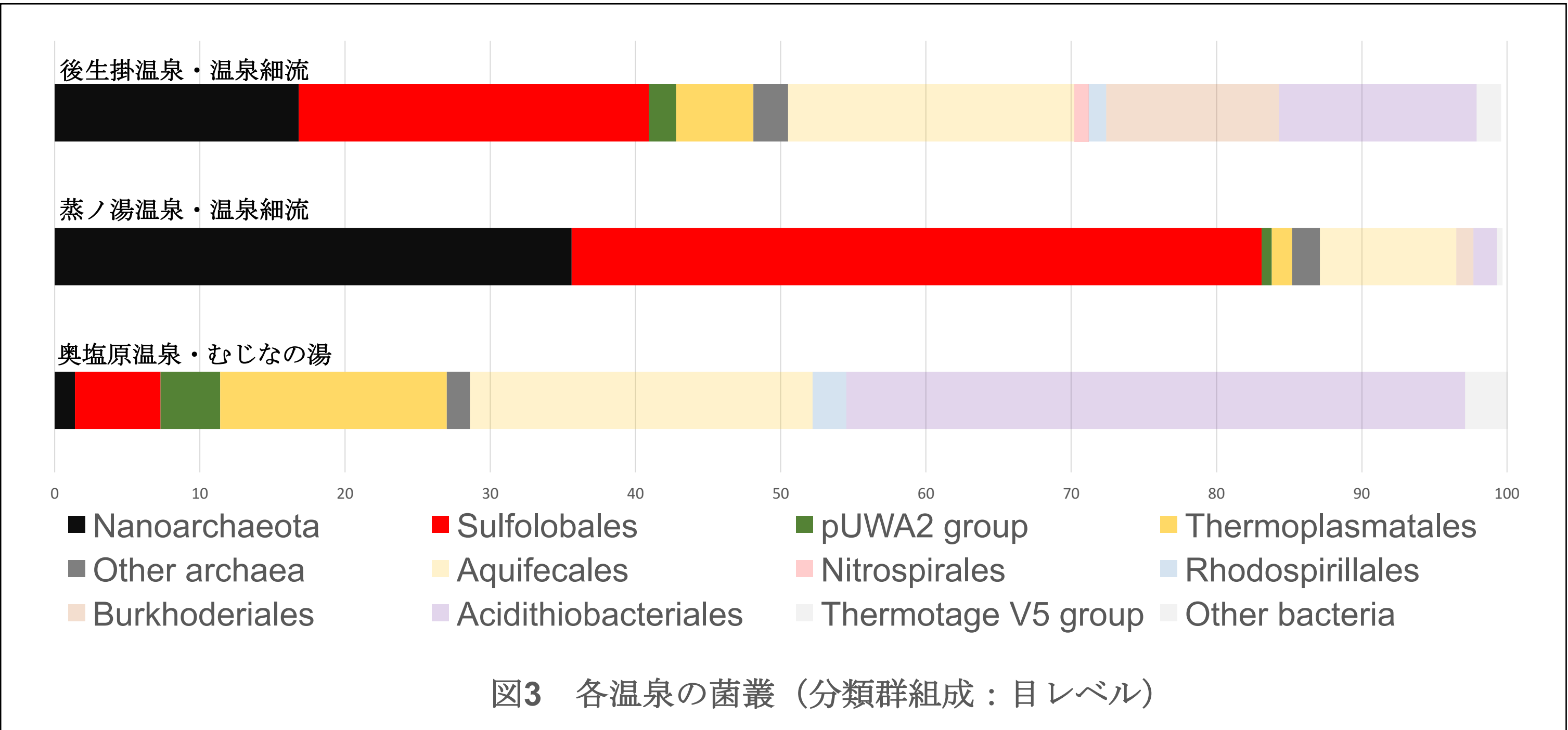


図3 各温泉の菌叢（分類群組成：目レベル）

目レベルによる分類群の構成を図1に示す. 各温泉のアーキア（ナノアーキアを除く）, ナノアーキア, バクテリアの比率は後生掛温泉でそれぞれ33.1%-17.0%-49.1%であり, 同様に蒸ノ湯温泉では51.0%-35.7%-12.6%, 奥塩原温泉では26.8%-1.5%-71.5%であった. すなわち, 野外の温泉細流から採集した試料にはアーキアが30%以上を占め, またアーキアの大半は*Crenarchaeota*に属し. そのほとんどは*Sulfolobaceae*科に属するものである. 一方, 温泉施設浴槽の菌叢はバクテリアが相対的に増加し, またアーキアにおいても*Crenarchaeota*よりも*Euryarchaeota*の方が多く検出された. 本温泉水も火山性酸性温泉であることを考えると, 浴槽内でバクテリアや*Euryarchaeota*が優勢に増殖したものと思われる. *Nanoarchaeota*は*Crenarchaeota*に共生（寄生）すると考えられており, これらの温泉における*Nanoarchaeota*の比率も*Crenarchaeota*の存在比に依存しているように思われた. 一方, *Nanoarchaeota*のホストアーキアとして知られている*Ignicoccus*属, *Acidilobus*属は検出されておらずこれらの*Nanoarchaeota*は*Sulfolobales*目などの*Crenarchaeota*をホストとしている可能性が高いものと思われた. また, *Nanoarchaeota*以外のナノアーキアとして*Micrarchaeota*に属するアーキアも各温泉で0.1~0.2%とごく低い検出率ながら検出されている. これらは*Euryarchaeota*である*Thermoplasmatales*目アーキアがホストとして有力視されているが, *Thermoplasmatales*が比較的多い奥塩原温泉で*Micrarchaeota*が特に多いという兆候は見られなかった.

非培養菌体及び培養菌体から*Nanoarchaeota*の検出 メンブレンフィルターで回収した非培養菌体のうち, 玉川温泉試料は一次PCR（primal PCR）あるいはネステッドPCR（nested PCR）においても*Nanoarchaeota*は検出できなかったが, それ以外の試料からは*Nanoarchaeota*が検出できた. 一方, 集積培養を実施したものはほぼ全てでアーキアまたはバクテリアの生育が確認されたが, 生育量が多かった12培養液の培養菌体を用いて*Nanoarchaeota*の検出を行った. これら非培養菌体及び培養菌体から検出できた*Nanoarchaeota*クローンは6つの小グループに分けることが可能であった（図5及び表2）. これらのうち, 一次PCRで検出できたのは奥塩原温泉・むじなの湯と蒸ノ湯温泉・温泉細流由来の未培養菌体, あるいは奥塩原温泉・むじなの湯の培養菌体（好気, pH2.5, 70°C, 硫酸添加または無添加）のみであった. 一方, 集積培養物を継代培養すると一次PCRによる検出は次第に困難となる傾向が観察された.

METHODS

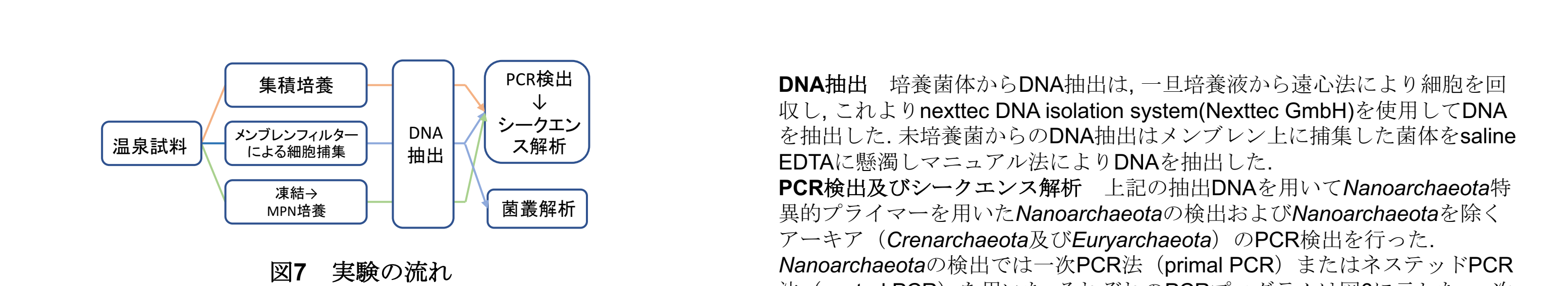


図7 実験の流れ

温泉試料 本研究では表1に示す栃木及び秋田県の温泉から温泉採取を行った. 温泉水は研究室に2日以内に持ち帰り, 直ちにメンブレンフィルターによる細胞捕集, 集積培養培地への接種, 5%DMSOを加えた凍結保存（-80°C）を行った. **集積培養** *Nanoarchaeota*の培養性について確認するために, *Sulfolobus*改変培地を用いて生育温度（45・70・85°C）, 気相（好気・N₂-CO₂ (4:1,v/v)・H₂-CO₂ (4:1,v/v)）, pH (2.5・5.0), 添加物の有無（硫酸・チオ硫酸・無添加）を変えていくつかの培養条件を設定し, 培養を行った. **メンブレンフィルターへの細胞捕集** 未培養菌体を得るため温泉水1リットルを一旦3.0 µm孔径メンブレンフィルターに通し, その濾液を0.2µm孔径メンブレンフィルターにて濾過し, メンブレン上に細胞を回収した. 本メンブレンは使用するまで-20°Cにて保存した. **MPN培養** 凍結保存してあった温泉水を融解後, 集積培地を用いて120倍, 1,200倍, 12,000倍に希釈し, それぞれ各1mlを50本ずつの3mlバイアル瓶に分注した後, 好気・pH2.5・70°C・硫酸存在下（Air, pH2.5, 70C, S）の条件で集積培養を行った.

COUNCLUSIONS/ DISCUSSION

- (1) *Nanoarchaeota*は日本の火山性温泉にもある程度の存在量を持って存在していた. また, 系統学的にもいくつかのグループに分けることができ, これらは他国の火山性温泉のものとは区別することが可能であった. これらの*Nanoarchaota*は宿主の系統関係よりも地域性や生育環境に依存して多様化した可能性もあるものと思われた.
- (2) これまで絶対嫌気性アーキアに共生・寄生しているものだけが知られていたが, 好気的な集積培養でもその存在が確認された. 特にGroup 6に属する*Nanoarchaeota*は系統枝も長く, その系統学的位置もユニークであった.
- (3) MPN培養法では, 検出できた一つのアーキア種から複数の異なる*Nanoarchaeota*クローンが検出された. これらアーキアが単一の細胞から生じたpure cultureである証拠はないが, 異なる*Nanoarchaeota*が同一のアーキアを宿主とする可能性も見いだされた. 今後はシングルセル・ゲノム解析法も用いて*Nanoarchaeota*の宿主特異性を検討してみたい.
- (4) 自然界の*Nanoarchaeota*の存在量に比べて, 今回培養化した*Nanoarchaeota*は宿主アーキアに比べて格段に少ないものであった. また継代培養によってもその存在比はさらに減少していくようであった. 今後は, *Nanoarchaeota*の減少を抑えるような培養法・保存法も検討する必要がある.

表2 培養菌体及び非培養菌体からPCR検出した*Nanoarchaeota*

Hot sring sample	Growth condition*	PCR Detection	Clone Group
奥塩原温泉・むじなの湯-1	Air, pH2.5, 70°C, N	Primal	6
	Air, pH2.5, 70°C, S	Primal	6
奥塩原温泉・むじなの湯-2	Not cultivated	Primal	1, 3
	Air, pH2.5, 70°C, N	Primal	1
	Air, pH2.5, 70°C, S	Primal	6
	Air, pH5.0, 70°C, S	Nested	1
玉川温泉・噴湯	Not cultivated	Nested	1, 4
	Air, pH2.5, 70°C, N	Nested	1
	Air, pH5.0, 45°C, N	Nested	4
	Air, pH5.0, 70°C, N	Nested	1
	N ₂ /CO ₂ , pH5.0, 45°C, TS	Nested	1
	N ₂ /CO ₂ , pH5.0, 70°C, TS	Nested	1
蒸ノ湯温泉・温泉細流	H ₂ /CO ₂ , pH5.0, 70°C, S	Nested	5
	Not cultivated	Primal	1
	Air, pH5.0, 70°C, N	Nested	1

*S, with S₀; TS, thiosulfate; without S₀ or thiosulfate.

表3 MPN/培養*菌体からPCR検出したアーキアと*Nanoarchaeota*

Archaeal Species	Culture	Clone Group (Number) §
<i>Acidianus</i> sp.	No. 103	2, 3 (3)
	No. 111	1, 2, 3 (6)
	No. 112	1, 3, 4 (5)
	No. 107, 109	Not determined
<i>Acidianus brierleyi</i>	No. 101	1, 2 (3)
	No. 102	1, 3 (3)
	No. 104	1, 2 (3)
	No. 105	2, 4 (2)
	No. 106	1, 2, 4 (3)
	No. 108, 110	Not determined

*Cultivated under air, at pH 2.5 and 70°C, with S₀.
§Numbers in parentheses are of clones analyzed.

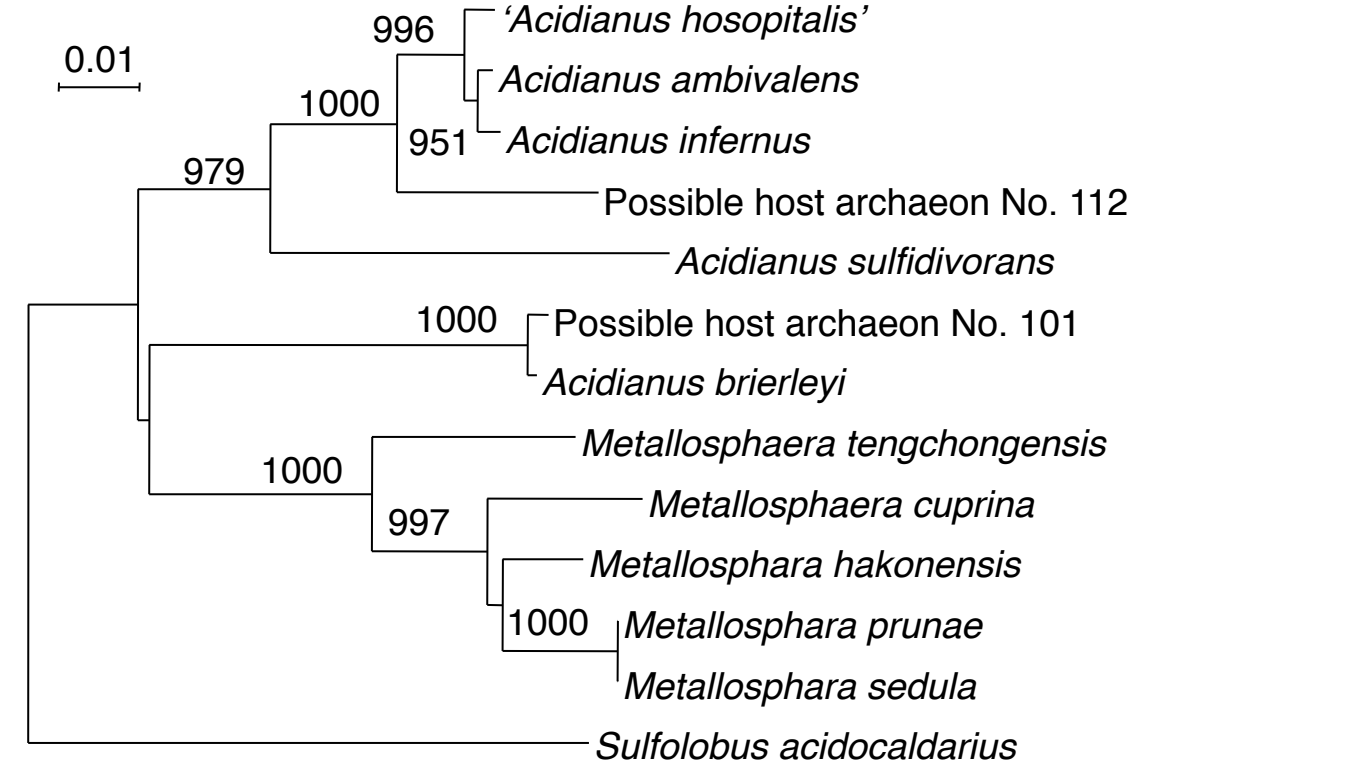
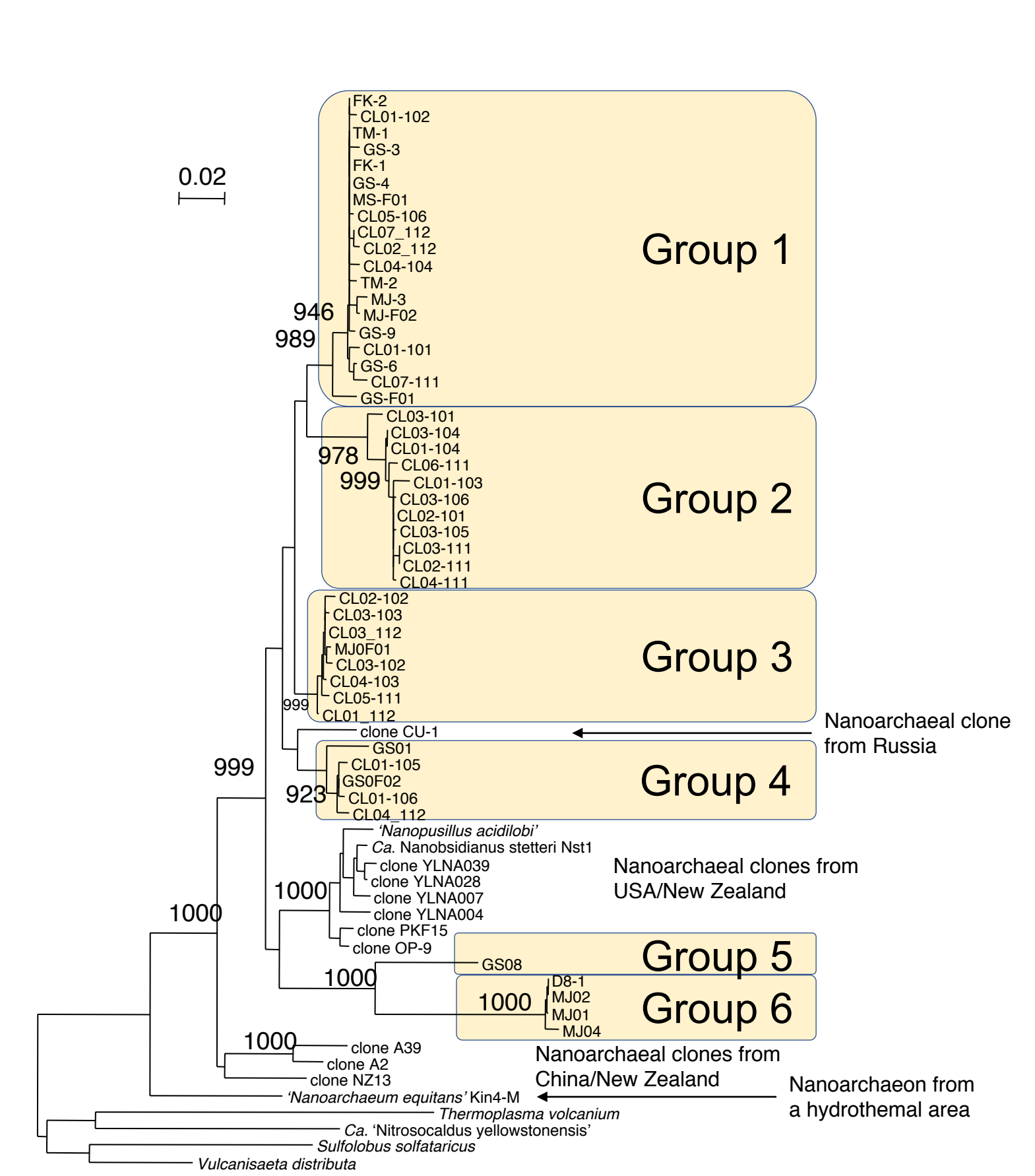


図6（上） 検出されたアーキアの系統樹. 近隣結合法による系統樹. 比較塩基数は816, ノードの数値はbootstrap値（1,000回）, barは0.01置換/塩基をします. アウトグループは*Sulfolobus acidocaldarius*.

図5（左） *Nanoarchaeota*の系統樹. 近隣結合法による系統樹. 比較塩基数は659, ノードの数値はbootstrap値（1,000回）, barは0.02置換/塩基をします. アウトグループは*Euryarchaeota*・*Thaumarchaeota*・*Crenarchaeota*代表種. Group 1~6は本研究で見いだされた*Nanoarchaeota*の小グループ.

METHODS

表4 本研究で使したPCRプライマー

Name	5'-Sequence (E.coli number)	Target	Reference
U790F	AAMGGGATTAGAKACC (781 > 797)	Universal	This study
U1110R	CGGGTCYKGTCTGTT (1101 <1115)	Universal	This study
7mcF	CTCCCGTTGATCTCGG (7 > 23)	Nanoarchaeota	(a)
1511mcR	CGCGTACCTTTGTGTGACCTTAG (1490< 1511)	Nanoarchaeota	(b)
NANO571F	GCYTTAAGSGYBGCTAGC (571> 588)	Nanoarchaeota	This study
N961R	CMATTAACCGCACCAC (944 < 961)	Nanoarchaeota	(b)
NA-1080R	CCTGTTAAGTCAGGAACC (1086 <1103)	Archaea	This study
NA-40F	GGCCACCGCTATCTCC (27 > 42)	Nanoarchaea	This study
ARCH21F	TTCCGGTTGATCTCYGCGGGA (7 >26)	Archaea	(c)
ARCH958R	YTCGGCGTTGAMTTCATT (958 < 976)	Archaea	(c)
A-910R	CGGCCAATTCCTTTAAG (910 < 927)	Archaea	This study

(a) Hohn et al., 2002; (b) Casanueva et al., 2008; (c) DeLong et al., 1992

REFERENCES

1. Huber, H. et al. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. Nature 417, 63-67.
2. Wurch, L. et al. 2016. Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic *Nanoarchaeota* system from a terrestrial geothermal environment. Nat. commun. 7, 12115.
3. Podar, M, et al. 2013. Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. Biol. Direct 8, 9.
4. Mardanov, A.V. et al. 2018. Microbial diversity in acidic thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka. Antonie van Leeuwenhoek (2018) 111: 35-43.