

捕食性バクテリア“ウアブ”の仲間を環境中から検出する

堀江 桃佳 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

‘*Candidatus Uab amorphum*’ (ウアブ) はプランクトミクス門に属する捕食性バクテリアである。ウアブはパラオ共和国の表層海水サンプルから発見され、扁平で通常直径 4~5 μm の丸や楕円の形をした細胞を持つ。純粋培養はできず、*Alteromonas macleodii* という温暖あるいは熱帯環境の海洋に生息するバクテリアとの二者培養によって培養される。共培養されるバクテリア細胞が多い場合には、大型化することもある。

ウアブは固形基質の上でアメーバのように細胞の形を変えながら移動することができる。さらに、ほかのバクテリアや小さい真核細胞などをファゴサイトーシス様の細胞取り込みシステムを使って取り込むこともできる。ファゴサイトーシスは真核生物特有の重要な機能の1つで、多くの遺伝子によって制御されている。しかし、ウアブは古細菌由来のアクチン様のタンパク質を除いてファゴサイトーシスに関わり得る真核遺伝子に相同な遺伝子を持たないため、形態・機能的な類似性はあるが、ウアブのファゴサイトーシスは真核生物のファゴサイトーシスと相同なものではないとされている。

こうしたことから、ウアブについての知見を深めることで、原核生物におけるファゴサイトーシス様機能の獲得機構や進化とともに、真核生物の重要な特徴であるファゴサイトーシス獲得の起源を明らかにすることができる可能性がある。また、真核生物は食作用によって他の生物を取り込むことでミトコンドリアを獲得し発展してきたと考えられているので、ウアブについて研究することは真核生物の起源を解明する上でも役立つと考えられている。

この卒業研究は、新たにウアブに近縁なバクテリアを野外から見つけてその実体を明らかにすることで、ウアブを含む系統群(ウアブクレード)内でファゴサイトーシスのメカニズムがどのように発展してきたのか、いつ獲得されたのかなどを知るために役立てることを目的としている。そのために、大学周辺の淡水環境からサンプルを採集し、サンプル中からのウアブ系統の検出、実体の観察を行った。

方法

・サンプル中からのウアブの検出

2020年6月25日、筑波大学内の兵太郎池、松見池、天の川の3か所で水や泥、落ち葉など計8サンプルを採取した。採集したサンプルから DNeasy Plant Mini Kit または PowerSoil DNA Isolation Kit を用いて DNA 抽出を行った。サンプルにウアブクレードのバクテリアが含まれるかどうかを確認するために、ウアブクレード特異的な 16S rDNA のプライマーを用いて PCR を行った。アガロースゲル電気泳動の結果バンドが見られた PCR 産物について、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製を行った。精製した PCR 産物は pGEM®-T Easy Vector Systems を用いてクローニングを行った。各 PCR 産物につき最大 20 コロニー (それ以下の場合には検出された全コロニー) を選抜し、インサート配列の全長を確認した。得られたインサート配列は、環境配列を含

む他のウアブクレードの配列とともに、最尤法により系統樹を作成した。

・ウアブの実体の検出

今回新たに見つかったウアブ系統バクテリアの実体を調べるために、Fluorescence in situ hybridization 法 (FISH 法) による細胞検出を試みた。天の川の下流で採集した泥から見つかったウアブ新規系統を対象に、特異的な PCR プライマーと FISH プロンプを作成した。サンプリングと同じ場所から新たに泥を採取し、FISH 観察と PCR を行った。FISH 観察は、天の川の新規系統に特異的な 4 つの FISH プロンプ (2 か所の配列とそれぞれに相補的な配列 2 つの計 4 つ) と全てのバクテリアを検出可能とされている EUB338 の 5 つのプロンプを使って行った。FISH 観察後、サンプルに目的の新規系統が含まれていたかどうかを確認するため、特異的な PCR プライマーを用いて PCR、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い、バンドが出るかどうかを確認した。FISH については現在実施中のため、結果及び考察は発表会にて口頭で発表する。

結果と考察

ウアブクレードに特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、兵太郎池の泥のサンプル、松見池の水と泥のサンプル、天の川の泥のサンプル 2 サンプルの合計 5 サンプルでバンドが検出され、51 のウアブクレードの配列を検出することができた。これまでウアブクレードのバクテリアは海水等塩濃度が高い環境や牛の胃の中等の特殊な環境から見つかったものが多かったが、今回サンプリングを行った淡水環境 3 か所すべてからウアブクレードが検出されたことから、ウアブクレードのバクテリアは様々な環境に適応していて淡水環境でも今後見つかっていく可能性はあると考えられる。

また今回得られた配列の中には、これまでウアブクレードにおいて報告のない系統に位置する配列が多く得られた。その中にはウアブに近縁な系統や、ウアブクレードの中で最も初期に分岐している系統が含まれていた。ウアブクレードの基部で分岐した系統が新たに見つかったことで、そのクレードに所属しているバクテリアの実体を今後さらに明らかにしていけば、ウアブのようにファゴサイトーシスを行っているかどうかや、行っている場合ウアブの行うファゴサイトーシスとの違いがあるのかどうかを調べることができ、ウアブクレード内でファゴサイトーシスのメカニズムがどのように変化してきたのかや、いつ獲得されたのかが分かってくるのではないかと考えられる。

参考文献

Shiratori, T., Suzuki, S., Kakizawa, Y., & Ishida K. (2019). *Nature Communications*. 10, 5529