

## 細胞サイズ別環境 DNA を用いた共生性シアノバクテリアの探索

宮本 知世 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中山 卓郎 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

海洋は地球上の広い面積を占め、海洋バイオマスの約 7 割は微生物で構成されている。特に光合成および窒素固定を行うシアノバクテリアは海洋の地球化学的循環において重要な役割を担っており、その多様性及び生態的特徴は広く研究されてきた。近年では次世代シーケンス技術を用いた環境 DNA 解析の発達により、海洋シアノバクテリアの多様性は網羅的に調査されている。

これまでの多様性解析は主に自由生活を行うシアノバクテリアを対象として行われてきた。その一方で、様々なシアノバクテリアが単細胞の真核生物など別の生物と強く共生した状態で海洋に広く分布することが明らかとなってきた。近年の研究により、このような共生性シアノバクテリアは従来の自由生活性シアノバクテリアを対象とした網羅的解析では検出されない場合があることが示されている。これを踏まえると、共生性シアノバクテリアの中にはこれまで見落とされてきた未知の多様性が存在する可能性があるが、共生性シアノバクテリアを対象とした網羅的な環境 DNA 解析は行われておらず、その多様性の全体像は明らかでない。

共生性シアノバクテリアが従来の多様性解析において検出されなかった原因には、環境から細胞を回収する際の濾過作業が関与すると考えられる。自由生活性シアノバクテリアを濃縮する過程において、多くの場合細胞サイズの大きな真核生物は排除されるが、その結果として共生性シアノバクテリアも排除されていたと予想される。そこで本研究では、真核生物画分を含む複数の細胞サイズ画分の環境 DNA について、シアノバクテリア 16S rDNA 配列の多様性を解析することにより、共生性シアノバクテリアの網羅的探索を試みた。

一般に環境 DNA 解析では、Illumina シーケンサー等のショートリードを用いてゲノム中の短い超可変領域を解析する、メタバーコーディング解析がよく用いられる。一方で短いバーコード配列では全く未知の配列に対する解釈に制限があり、新しい系統の検出には不向きと考えられる。よって本研究では PacBio シーケンサーによるロングリードシーケンスを用いる試みを実施した。シアノバクテリア全体の分子系統解析に利用可能な比較的長い配列を解析することで、未知のシアノバクテリア系統の効率的な探索を目指した。

## 【材料と方法】

## 細胞サイズ画分ごとの環境 DNA の抽出

静岡県下田沖で採取された海水サンプルを、フィルター濾過により 0.45-5、5-20、20-120 $\mu$ m の細胞サイズ画分に分けてそれぞれ DNA を抽出した。当該作業は本研究の開始以前に研究室内の先行研究によって行われていた。

## 16SrDNA 配列の増幅およびロングリードシーケンス

3つのサイズ画分の環境 DNA について、シアノバクテリア 16S rDNA 特異的プライマーセットを用いて約 1 kbp の部分配列を増幅した。得られた PCR 産物について、PacBio シーケンサーでロ

ングリードシーケンスを実施した。本研究では、単一分子を複数回解析して得られる高精度なコンセンサス配列 (CCS 配列) を取得し解析に用いた。

## 分子系統解析データセットの作製

16S rDNA 配列が入手可能なシアノバクテリアの全ての属について、rDNA のデータベースである RDP、Silva、および GenBank より各属複数配列ずつ 16SrDNA 配列を入手した。これらより CD-HIT を用いて多様性を保持しつつ冗長性を削減し、系統解析を行うためのシアノバクテリアのデータセットに利用した。また、共生性シアノバクテリア由来の可能性のある既知配列を GenBank より取得し系統解析に含めた。

各細胞サイズ画分から得られた CCS 配列について、遺伝的距離に基づいて配列の系統的な冗長性を削減し、系統解析に用いる配列を選択した。

収集した 16S rDNA 配列から MAFFT を用いて多重アライメントを作成した。さらに trimAl によって系統解析に適さない座位のトリミングを行うことで系統解析に供するデータセットを作成した。

## 系統解析

得られたデータセットを用いて IQ-TREE による最尤系統解析を行った。塩基置換モデルには GTR+I+F モデルを用い、ultrafast bootstrap approximation によって各枝の信頼性を評価した。

## 【結果と考察】

0.45-5、5-20、20-120 $\mu$ m のサイズ画分環境 DNA よりそれぞれ 6,692、16,333、16,028 の PacBio CCS 配列が得られた。そのうち約 65% のリードで 99.99% 以上の推定精度が認められ、リード全体の推定精度の平均値は約 99.9% であった。また、各サイズ画分の CCS 配列でユニークな配列はそれぞれ 4,540、9,059、7,127 であった。

単細胞性かつ自由生活性のシアノバクテリアは 0.45-5 $\mu$ m のサイズ画分に検出されると予想できる。本研究では単細胞性の系統にもかかわらず、真核生物のサイズである 5-20、20-120 $\mu$ m 画分に多く現れる系統に着目して系統解析結果を精査した。

5-20 $\mu$ m のサイズ画分から海洋性珪藻 (*Epithemia pelagica*) の細胞内に絶対共生するシアノバクテリアの配列が発見された。この細胞内共生シアノバクテリアが海洋に分布することは最近まで知られておらず、従来の多様性解析において見落とされてきたとされる。このことから本研究の手法は共生性シアノバクテリアを検出する上で有効である事が示唆された。

さらに系統樹には 5-20、20-120 $\mu$ m 画分から得られた配列が優占する系統が複数見られた。これらの系統は未知の共生性シアノバクテリア系統である可能性があり、研究発表において詳しく論じる。