

1. 要旨

国際宇宙ステーション (ISS) 内の微生物群集を理解し制御することは、宇宙飛行士の健康を支えるために重要である。宇宙飛行士の免疫システムは、微小重力、放射線、長期のストレスなどの環境下で変化することがあると言われているからである。しかし、ISS 環境における細菌の生存に重要な役割を果たす遺伝子や機能を特定した研究はほとんどない。そこで、ISS 環境から分離された細菌に特異的な遺伝子を同定することを目的とした。そこで、ゲノム配列が公開されている近縁種の細菌と ISS 分離株の比較ゲノム解析を実施したところ、ISS 環境から分離された細菌に特有の遺伝子が見つかった。これらの遺伝子は、ISS の環境下で細菌が生存するために重要な役割を担っている可能性がある。

2. 背景

近年、宇宙開発が活発化し、国際宇宙ステーション (ISS) を利用した有人長期宇宙飛行 (<https://www.nasa.gov/feature/space-station-20th-long-duration-missions>) が実施されている。また人と人との間で微生物が交換されていることを考えると [6]、建物内の微生物と人との関係を理解することは、室内にいる人の精神的 [2]、身体的健康の維持に役立つと思われる。そのため、ISS に滞在する宇宙飛行士の健康を支えるために、ISS の微生物群集を理解し制御することが重要である [1]。ISS の微生物 (以下、ISS 細菌) に関するこれまでの研究では、16S rRNA 遺伝子シーケンス、ショットガン・メタゲノムシーケンス、培養ベースなど様々な手法を用いて ISS 細菌の分類学および機能的構成を調査してきた [1] [4] [5]。しかし、全体として、ISS への適応に重要な役割を果たすと思われる遺伝子は不明なままである。異なる環境から分離された近縁種の比較ゲノム解析 [7] [8] は、環境適応に関連する遺伝子群を同定するのに役立つと考えられる。

本研究では、ゲノム配列が公開されている ISS 分離株とその近縁種細菌 (*Enterobacter bugandensis*, *Pantoea brenneri* など) の比較ゲノミクスを実施した。ISS 株に存在し、他の株には存在しない ISS 環境下での細菌の生存に関連すると考えられる、遺伝子 (「ISS 株固有遺伝子」) を同定した。

3. 材料と方法

PubMed データベースから「ISS」「マイクロバイオーム」「細菌」のキーワードで検索して見つかった 2017～2020 年に発表された論文および 2016 年以前に発表されたレビュー論文の中から、全ゲノムシーケンス (WGS) を用いた研究論文のみを抽出した。そして、これらの論文を参考に、同一種内で 1 株のみ登録されている菌株を除いた 76 株の ISS 環境から単離されたゲノム (「ISS 株」) をダウンロードした (表 1)。また、ISS 株と同種異株 (「その他の株」) の 560 株の全ゲノムがダウンロードされた。ゲノム配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) genome list (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から入手した。その後ゲノムリアノテーション、パンゲノム解析、系統推定を実施した。系統推定はコア遺伝子の配列アライメントをもとに行われた。その後オーソログ遺伝子を同定し、その遺伝子の有無 (Pangenome cluster presence/absence) をもとに樹形図を作成した。遺伝子含量のデンドログラムは、オーソログ遺伝子に着目した遺伝子レパートリーの有無に基づき作成した。ISS 株に存在し、Other 株に存在しない遺伝子 (ISS 株ユニーク遺伝子) は、Pan-genome-wide association analysis により同定した [10]。

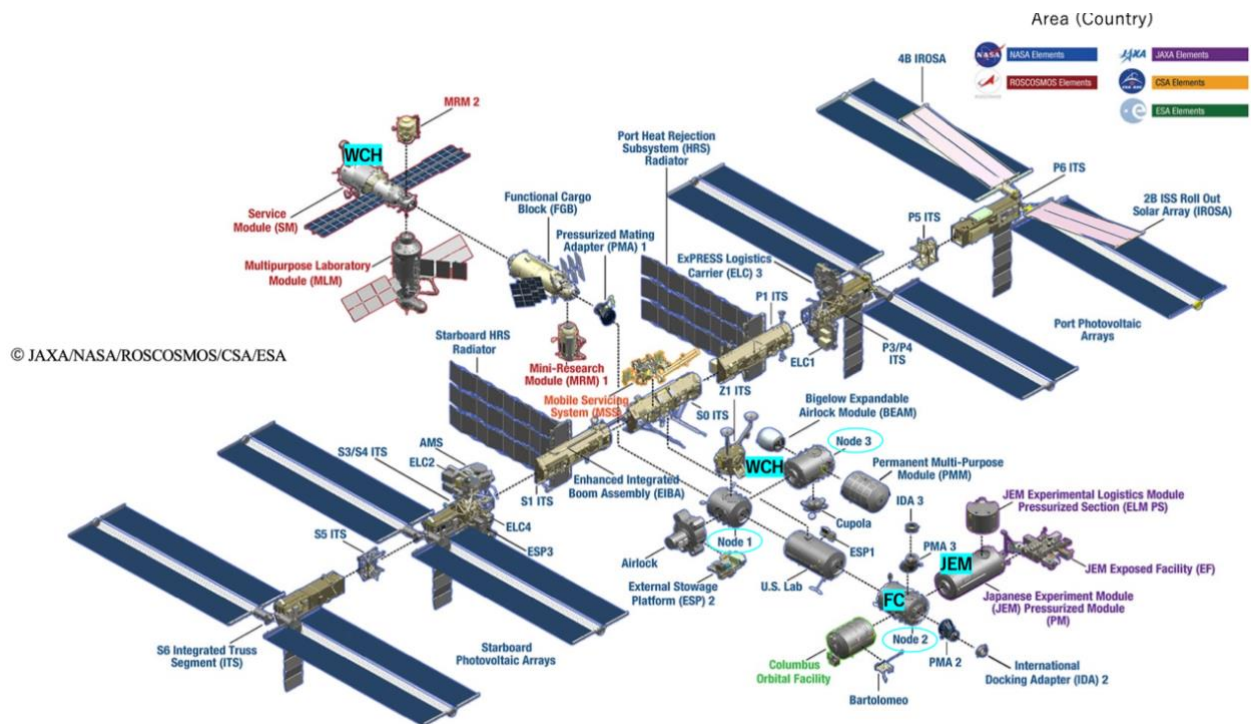


図 1. 細菌を分離した国際宇宙ステーションのサンプリングエリア（独立行政法人宇宙航空研究開発機構：JAXA, National Aeronautics and Space Administration：NASA, Main components of the ISS, 2022-01-21, <https://humans-in-space.jaxa.jp/iss/about/config/>)

水色：サンプリングポイント

FC：フィールドコントロール（ノード2の中央でサンプリングワイプを120秒間大気に晒す）

JEM：きぼう日本実験棟

ISS SRV-K フィルター反応器廃液：ソユーズ10Sで返却されたISS SRV-K フィルター反応器廃液：ロシアセグメント

ISS SVO-ZV：スペースシャトルミッションSTS-104で帰還したISS SVO-ZV，ロシアセグメント

WCH：Waste and Hygiene compartment（廃棄物・衛生区画）

貯水・吐水システム：SRV-K（再生），SVO-ZV（貯水）

4. 結果・考察

4.1. 比較ゲノム解析

まず各株のシングルコピー・コア遺伝子の塩基配列アライメントを連結して得られた系統樹より系統推定を行い、ISS株が単一のクレードを形成するか確認した。さらに、株間の遺伝子含有量の非類似度（タンパク質ファミリーの有無）を基に構築したデンドログラムをプロットし、ISS株が単一のクラスターを形成するか確認した。解析した14種のうち4種（表1）において、系統樹ではISS株がクレードを形成し（互いに近縁である）、遺伝子含有量のデンドログラムではISS株が単一のクラスターを形成した（Other株と比較して、より類似した遺伝子有無のパターンを持っている）。

Table 1. 使用したデータのメタデータと結果のまとめ

Species (a)	Number of ISS strains (b)	Number of Other strains (complete) (c)	ISS Monophyly (d)	ISS clustered by gene content (e)	Reference (f)
<i>Acinetobacter pittii</i>	1	30	NA	NA	This study
<i>Aerococcus urinaequi</i>	2	3	YES	YES	This study
<i>Bacillus cereus</i>	8	46	YES	YES	Ryan A. Blaustein et al., 2019
<i>Cupriavidus metallidurans and Ralstonia pickettii</i>	5	8	NO	NO	This study
<i>Enterobacter bugandensis</i>	7	4	YES	YES	This study
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	386	NO	NO	Noelle C. Bryan et al., 2020
<i>Enterococcus faecium</i>	1	205	NA	NA	This study
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	8	NA	NA	This study
<i>Pantoea brenneri</i>	16	3	YES	YES	This study
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	2	26	YES	YES	This study
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	26	NA	NA	This study
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	84	YES	YES	Ryan A. Blaustein et al., 2019
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	16	NA	NA	This study
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	7	NA	NA	This study

(a) 生物種の名称 (b) 本研究で解析した ISS 株の数 (c) 本研究で解析した Other 株の数 (d) 系統樹において ISS 株がクレードを形成しているか否か (YES or NO) (e) 樹形図で ISS 株が単一のクラスターを形成しているか否か (YES or NO) (f) (d,f) の結果についての参考文献

4.2. パンゲノムワイド関連解析

Table1 のうち *Pantoea brenneri* の ISS 株とその他の株のゲノムを用いて、ISS 株に特異的な遺伝子があるか確かめた。一方、*Enterobacter bugandensis* の解析には、NCBI に登録されている全株の解析がうまくいかなかったため、ISS 株 (Contigs) 7 株と Other 株 (Complete Genomes) 4 株を使用した。*Pantoea brenneri* と *Enterobacter bugandensis* では、ISS 株固有遺伝子の半数以上が「仮説的タンパク質」であった。ISS 株ユニーク遺伝子には、鞭毛や水銀耐性に関連する遺伝子 (*Pantoea brenneri*)、免疫反応や DNA 保護・修復などの外的要因から細胞を守る遺伝子 (*Enterobacter bugandensis*) などが含まれていた。今回同定された ISS 株特有の遺伝子は、ISS の環境下で生き残るために重要な役割を担っている可能性がある。*Enterobacter bugandensis* は、様々な地層で敗血症の原因菌として血液から分離されており [11]、ISS から分離されている [6][12]。また先行研究では、MDR tripartite system を含む抗生物質や毒性化合物に対する耐性に関連する遺伝子が ISS 株から同定されたとされている [9]。本研究で単一クレードを形成した ISS 株に特異的な遺伝子は、病原株の生存のシステムにも関与している可能性がある。先行研究では、ISS から分離された *Enterobacter bugandensis* 株の抗菌薬耐性 (AMR) 表現型、多剤耐性 (MDR) 遺伝子プロファイル、潜在的な病原性に関与する遺伝子が示唆された [9]。しかし、それらの遺伝子が他の場所から分離されたゲノムに存在するのか、つまり ISS に特異的な遺伝子なのかどうかは不明であった。また、本研究では、臨床株との比較解析を行い、ISS における病原細菌の生存機構を解明する予定である。そのため、今後、パンゲノム関連解析を行う最近種を増やし、統計的に有意な ISS 株の固有遺伝子を明らかにする必要がある。また、swiss-prot 以外のデータベースで仮説的なタンパク質をコードする遺伝子をアノテーションし、AlphaFold2 を用いてタンパク質の機能を解析する予定である。

表 2. 各生物種について、ISS 株に存在し、Other 株に存在しない遺伝子の例（ISS 株固有遺伝子）。*Pantoea brenneri* と *Enterobacter bugandensis*（論文化予定につき一部のみ）

Organism_name	Gene	Protein	Number
	<i>alkJ</i>	Alcohol dehydrogenase [acceptor]	1
	<i>cadC</i>	Transcriptional activator CadC	1
	<i>cdil</i>	Immunity protein Cdil	1
	<i>chuR</i>	Anaerobic sulfatase-maturing enzyme	1
	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1
	<i>corA</i>	Cobalt/magnesium transport protein CorA	1
	<i>cpdA</i>	3'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA	1
	<i>csbX</i>	Alpha-ketoglutarate permease	1
	<i>dnaB</i>	Replicative DNA helicase	1
	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	1
	<i>ehpR</i>	Phenazine antibiotic resistance protein EhpR	1
	<i>fadL</i>	Long-chain fatty acid transport protein	1
	<i>fdnG</i>	Formate dehydrogenase%2C nitrate-inducible%2C major subunit	1
	<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein FlgB	1
	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein FlgE	1
	<i>flgH</i>	Flagellar L-ring protein	1
	<i>flgI</i>	Flagellar P-ring protein	1
	<i>flgL</i>	Flagellar hook-associated protein 3	1
	<i>flhB</i>	Flagellar biosynthetic protein FlhB	1

Organism_name	Gene	Protein	Number
	<i>bvgA</i>	Virulence factors putative positive transcription regulator BvgA	1
	<i>capV</i>	cGAMP-activated phospholipase	1
	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1
	<i>dam</i>	DNA adenine methylase	1
	<i>dncV</i>	Cyclic GMP-AMP synthase	1
	<i>etk</i>	Tyrosine-protein kinase etk	1
	<i>fdtA</i>	TDP-4-oxo-6-deoxy-alpha-D-glucose-3-C4-oxoisomerase	1
	<i>fdtB</i>	dTDP-3-amino-3-C6-dideoxy-alpha-D-galactopyranose transaminase	1
	<i>ftsH</i>	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	1
	<i>hin</i>	DNA-invertase hin	1
	<i>imm</i>	Colicin-E3 immunity protein	1

黄色は *Pantoea brenneri*, 緑は *Enterobacter bugandensis*.

5. 謝辞

鈴木治夫准教授には、長年のアドバイスをいただき感謝申し上げます。また、富田勝教授に心から感謝致します。このプロジェクトは、森泰吉郎記念研究の助成を受けたものです。このような貴重な研究の機会を与えてくださった森ファンド運営委員会の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

- [1] A. Checinska *et al.*, "Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities.," *Microbiome*, vol. 3, p. 50, Oct. 2015.
- [2] R. A. Blaustein, A. G. McFarland, S. Ben Maamar, A. Lopez, S. Castro-Wallace, and E. M. Hartmann, "Pangenomic Approach To Understanding Microbial Adaptations within a Model Built Environment, the International Space Station, Relative to Human Hosts and Soil," *mSystems*, vol. 4, no. 1, Jan. 2019.
- [3] N. C. Bryan, F. Lebreton, M. Gilmore, G. Ruvkun, M. T. Zuber, and C. E. Carr, "Genomic and Functional Characterization of Enterococcus faecalis Isolates Recovered From the International Space Station and Their Potential for Pathogenicity," *Front. Microbiol.*, vol. 11, Jan. 2021.
- [4] L. Y. Sobisch *et al.*, "Biofilm forming antibiotic resistant gram-positive pathogens isolated from surfaces on the international space station," *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. MAR, pp. 1–16, 2019.
- [5] N. A. Be *et al.*, "Whole metagenome profiles of particulates collected from the International Space Station," *Microbiome*, vol. 5, no. 1, p. 81, 2017.
- [6] A. C. Sielaff, N. K. Singh, J. E. Allen, J. Thissen, C. Jaing, and K. Venkateswaran, "Draft genome sequences of biosafety level 2 opportunistic pathogens isolated from the environmental surfaces of the international space station," *Genome Announc.*, vol. 4, no. 6, Dec. 2016.

- [7] M. Harada *et al.*, “Genomic analysis of *Pseudomonas* sp. Strain SCT, an iodate-reducing bacterium isolated from marine sediment, reveals a possible use for bioremediation,” *G3 Genes, Genomes, Genet.*, vol. 9, no. 5, pp. 1321–1329, May 2019.
- [8] N. Merino, S. Zhang, M. Tomita, and H. Suzuki, “Comparative genomics of Bacteria commonly identified in the built environment,” *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, Jan. 2019.
- [9] N. K. Singh, D. Bezdan, A. Checinska Sielaff, K. Wheeler, C. E. Mason, and K. Venkateswaran, “Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains,” *BMC Microbiol.*, vol. 18, no. 1, p. 175, Dec. 2018.
- [10] O. Brynildsrud, J. Bohlin, L. Scheffer, and V. Eldholm, “Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, Nov. 2016.
- [11] S. Doijad *et al.*, “*Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 66, no. 2, pp. 968–974, Feb. 2016.
- [12] A. R. Bharadwaj *et al.*, “Draft Genome Sequences of Enterobacteriales Strains Isolated from the International Space Station,” *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 9, no. 37, Sep. 2020.

本研究費で行った研究の発表実績

2021年10月 日本微生物生態学会 第34回大会 ポスター発表

2021年12月 第44回日本分子生物学会年会 ポスター発表