

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07206

研究課題名(和文) 深海熱水生態系の遺伝子水平伝播に関わる細胞外膜小胞の網羅的機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of extracellular membrane vesicles involved in horizontal genetic transfer in deep-sea hydrothermal environments

研究代表者

吉田 ゆかり (YOSHIDA, Yukari)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・技術主任

研究者番号：10553216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：深海底熱水活動域における細胞外膜小胞の生態学的・進化的機能を把握するため、イプシロンプロテオバクテリア綱の化学合成独立栄養細菌が産生する細胞外膜小胞に内包される遺伝情報を明らかにした。分離したイプシロンプロテオバクテリアの単離株のうち、細胞外膜小胞の産生能が高い株を代表株として細胞外膜小胞内から精製した核酸をシーケンス解析した結果、細胞外膜小胞内にゲノム全体がほぼ均等に内包されていることが明らかとなった。したがって、イプシロンプロテオバクテリアにおいて細胞外膜小胞を介した遺伝子伝播機構が存在する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、初期生命の誕生場所として考えられている熱水生態系で一次生産を駆動するイプシロンプロテオバクテリアにおいて、それらの産生する細胞外膜小胞があらたな遺伝子伝播因子として生態学・進化的に重要な役割を担う可能性を示しており、原始生命の進化プロセスに果たしてきた細胞外膜小胞の寄与の理解に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the ecological and evolutionary functions of extracellular outer membrane vesicles in deep-sea hydrothermal environments, we analyzed the DNA content of membrane vesicles released by chemolithoautotrophic microorganisms which belong to the class Epsilonproteobacteria. We choose the strain which produces the most abundant vesicles as the representative strain from Epsilonproteobacterial isolates, and sequenced DNA purified from the membrane vesicles. We revealed that the strain released DNA within vesicles, which encoded broadly distributed regions of the genome. This suggests that membrane vesicles could have important implications for mechanisms of horizontal gene transfer in deep-sea hydrothermal ecosystems.

研究分野：微生物生態学

キーワード：深海熱水噴出域 細胞外膜小胞 イプシロンプロテオバクテリア 次世代シーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌の中でもグラム陰性細菌は、細胞外に直径約 20~300 nm の膜小胞と呼ばれる小型・球形の構造体を恒常的に分泌する。この際、細胞内に存在する様々なタンパク質・脂質・核酸などが膜小胞内部に取り込まれ、他の細胞へ輸送・伝達されるため、物質輸送媒体として生物学的・生態学的に重要な機能を担っている。特に、核酸の輸送は、異種細菌間における遺伝子水平伝播により、受容菌への薬剤耐性やあらたな代謝機構の獲得をもたらすことから、細菌の環境適応や多様化・進化において非常に重要な役割を担っている。

イブシロンプロテオバクテリア(綱)の化学合成独立栄養細菌は、世界各地の深海底熱水活動域において、重要な一次生産者として最も普遍的に優占している系統群である。熱水環境に生息するイブシロンプロテオバクテリアは、株レベルで多様なエネルギー代謝能を有しているが、その多様な代謝能は系統関係を反映しないことから、代謝遺伝子が水平伝播により獲得されてきたとの見方が有力である。上述の通り、細胞外膜小胞は近年、あらたな遺伝子伝播因子として注目されており、イブシロンプロテオバクテリアにおいても細胞外膜小胞を介した遺伝子伝播機構が存在する可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、深海底熱水活動域において、多様なエネルギー代謝経路を持ち、ダイナミックな熱水環境に適応したイブシロンプロテオバクテリア綱の化学合成独立栄養細菌について、細胞外膜小胞に内包される遺伝情報の特徴を明確化した。

### 3. 研究の方法

イブシロンプロテオバクテリアを深海底熱水活動域から単離し、系統学的分類データを付与することで培養株の整備を行うとともに、次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析によりドラフトゲノム配列を取得した。次に、単離菌株から細胞外膜小胞画分を分離し、細胞外膜小胞の産生能の有無を明らかにするとともに、得られた細胞外膜小胞について形態学的特徴を明らかにした。細胞外膜小胞の産生量が多かった単離菌株を代表株とし、細胞外膜小胞に内包される遺伝情報の特徴を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 深海底熱水活動域からのイブシロンプロテオバクテリアの単離・培養

沖縄トラフに位置する深海底熱水活動域から採取したチムニーやバクテリアマットなどの様々な試料を用いて、分子系統レベルや代謝能が異なる多様なイブシロンプロテオバクテリア計 38 株を単離した。このうち、より系統学的に分岐が早いと考えられる *Nautilia* 属 1 株、*Nitratiruptor* 属 6 株の計 7 株のドラフトゲノム配列を決定した。

#### (2) 細胞外膜小胞の産生能とその形態学的特徴

ドラフトゲノム配列を決定した単離菌株の培養液から、Optiprep を用いた密度勾配遠心法により細胞外膜小胞画分を分離・精製し、ネガティブ染色後、電子顕微鏡下で観察し、各単離菌株の細胞外膜小胞の産生能の有無を調べた。その結果、調べた 7 株のうち、*Nautilia* sp. YY08-34 株、*Nitratiruptor* sp. SB155-2 株、YY08-10 株、YY08-14 株および YY09-18 株においては、ウイルス粒子とは明らかに異なる不均一な大きさの球形の細胞外膜小胞が確認された(図 1、2)。なかでも *Nautilia* sp. YY08-34 株は非常に多くの細胞外膜小胞を産生することが明らかとなった。一方、残りの 2 株である *Nitratiruptor* sp. YY08-13 株および YY08-26 株においては、上述の球形の細胞外膜小胞に加え、細胞外膜小胞が鞘のような構造体に包まれており、nanopods や nanotube と呼ばれる構造体と非常に類似していることが確認された(図 2)。株間で細胞外膜小胞の産生量や形態に違いがみられたものの、調べた 7 株全てにおいて細胞外膜小胞の産生が認められたことから、イブシロンプロテオバクテリアの生活史において細胞外膜小胞が重要な働きを持っていると考えられた。

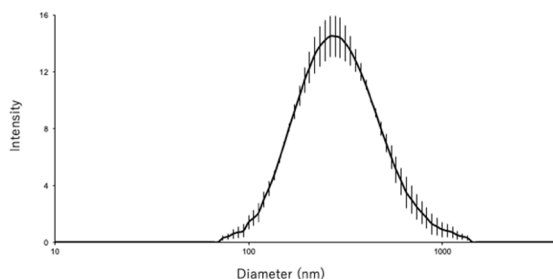


図 1. *Nautilia* sp. YY08-34 株の細胞外膜小胞のサイズ分布

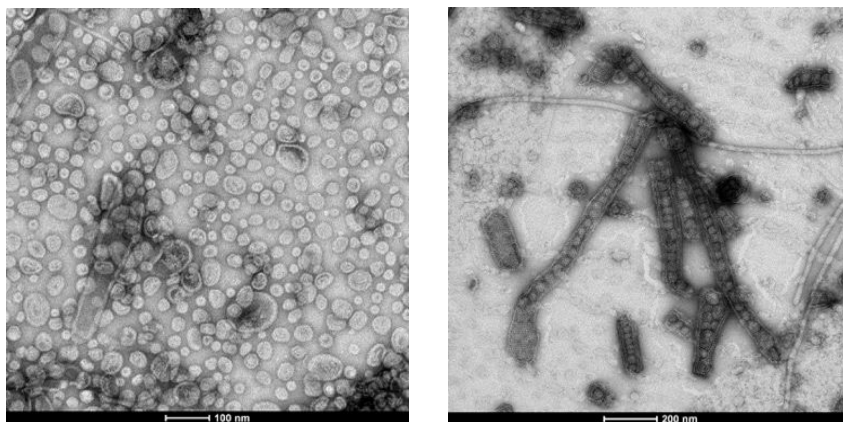


図 2. *Nautilia* sp. YY08-34 株 (左) および *Nitratiruptor* sp. YY08-13 株 (右) の細胞外膜小胞のネガティブ染色像。

### (3) 細胞外膜小胞内の遺伝情報解析

イプシロンプロテオバクテリアの単離株のうち、細胞外膜小胞の産生能が高い *Nautilia* sp. YY08-34 株を代表株として用い、精製した細胞外膜小胞から DNA を抽出した。微量核酸を増幅する方法として、REPLI-g Mini Kit を用いて微量核酸増幅後にライブラリ作製、KAPA HyperPrep kit を用いて微量 DNA からのライブラリ作製、の 2 種類の異なる方法によりライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析を行った。その結果、どちらのライブラリ作製法においても、*Nautilia* sp. YY08-34 株のドラフトゲノム配列と一致する配列が得られ、細胞外膜小胞内に DNA 断片が内包されていることが明らかとなった。さらに、得られた配列リード数から各機能遺伝子の含有量を定量化したところ、特定の領域に偏ることなく(プロファージ領域を除く)、ゲノム全体がほぼ均等に細胞外膜小胞内に内包されていることが明らかとなった。したがって、イプシロンプロテオバクテリアにおいても他の細菌と同様に細胞外膜小胞を介した遺伝子伝播機構が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 ゆかり, 吉田 光宏, 西 真郎, 高木 善弘, 高井 研
2. 発表標題 イプシロンプロテオバクテリアが産生する細胞外膜小胞の形態学的・遺伝学的特徴
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高木 善弘  (TAKAKI Yoshihiro)		
研究協力者	吉田 光宏  (YOSHIDA Mitsuhiro)		