

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01869

研究課題名(和文) 生育環境に依存して変動する生物代謝に伴う同位体効果の支配要因を遺伝子解析で調べる

研究課題名(英文) Possible linkage between metabolic isotope effects and transcriptome

研究代表者

川口 慎介 (KAWAGUCCI, Shinsuke)

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)・研究員

研究者番号：50553088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、安定同位体指標を適切に利用するため、天然環境で起こりうる安定同位体組成の変動要因を把握することを目的に、メタン生成古細菌を培養するとともに、培地における同位体システムチクスの定量および発現遺伝子の解析を試みた。メタン生成古細菌の培養における適切な培地条件を選定し、培地に含まれるメタン・二酸化炭素・水・水素ガスそれぞれの炭素・水素安定同位体組成を分析した。また酸素のない嫌気的環境で生育するメタン生成古細菌について、発現遺伝子の解析に適した試料処理条件の検討を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安定同位体組成による生態系活性計測は、環境学ならびに地球化学分野においてすでに広く利用されている手法である。しかし、その指標の妥当性についての検証、とりわけ安定同位体組成の支配要因については、いまだブラックボックスとして残されている。本研究は、分子生物学/微生物生理学分野で培われた「培養に基づく遺伝子発現の調査」を活用することで、ブラックボックスの中身を覗こうとする試みであった。トランスクリプトーム解析および安定同位体分析という両分野の先端技術を融合することで、これまで知ることが困難であった細胞内現象と安定同位体組成環境動態の相互作用に迫った。

研究成果の概要(英文)：This project aims to understand crucial environmental/physiological factor of stable isotope systematics among methane and relevant molecules to develop stable isotope ratios as accurate and precise tracer for geochemical cycle and activity of microbial ecosystem. For this purpose, this project cultivated a methanogenic isolate, *Methanothermobacter thermautotrophicus* H, under various condition followed by analyses of stable isotope systematics and transcriptome. Appropriate setting for cultivation was at first determined, and then analyses of multiple isotope ratios such as hydrogen isotope ratios of methane, hydrogen, and water as well as carbon isotope ratios of methane and carbon dioxide were carried out. Treatments for transcriptome analysis of anaerobic methanogen under oxic laboratory environment were also examined to develop appropriate manner.

研究分野：深海科学

キーワード：安定同位体効果 トランスクリプトーム解析 メタン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生態系動態と密接に関わる軽元素 (C・H・N・O・S) の安定同位体組成は、環境動態解析の指標として広く利用されている。近年、微量分析が可能な連続フロー型質量分析法 (CF-IRMS) [たとえば角皆 2002 地球化学] や現場モニタリングが可能な分光分析法 [たとえば Wahl et al. 2006 IEHS] の普及により、環境試料分析データ蓄積が急速に進んでいる。安定同位体組成を組み込んだ環境変動予測モデルも次々に提案されており [たとえば Casciotti 2016 Annu Rev Mar Sci]、これからも環境動態解析において安定同位体指標が利用され続けることに疑う余地はない。

安定同位体組成から物質循環・生態系動態を正確に読み解くためには、対象とする環境で起こりうる安定同位体組成の変動過程および変化量 (これを以下では同位体効果と呼ぶ) を把握していることが肝要である。物理過程あるいは無機化学反応に伴う同位体効果に対しては、熱力学計算による推定および実験検証 [たとえば Reeves et al. 2012 Geochim Cosmochim Acta] が容易であり、環境解析指標としての堅牢な基盤が担保されている。

一方で、生物代謝は複数の酵素で触媒される多段階の反応群からなるため、熱力学計算による同位体効果の推定が困難である。このため生物代謝に伴う同位体効果の大半については、同位体効果の現場である代謝経路をブラックボックスとしたまま、環境動態指標として利用する状況が続いている [たとえば Valentine et al. 2004 Geochim Cosmochim Acta]。

代表者は生命の起源あるいは生命圏の限界を追究するためにメタンの極限環境での動態解析指標確立を目的とした研究を進めている。これまでに、二酸化炭素を基質としてメタンを生成する「メタン生成代謝」に関与する複数分子間の同位体効果 (=同位体システムチクス) をメタン生成古細菌 (以下、メタン菌と略記) 分離株培養によって調査してきた [Kawagucci et al. 2014 Geochim Cosmochim Acta; Okumura et al. 2016 PEPS]。

一連の研究により、二酸化炭素からメタンが生成する際の炭素同位体効果 (CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>) および水とメタンの間に生じる見かけの水素同位体効果 (CH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) が、培地の水素ガス分圧および微生物増殖速度と相関して極めて大きく変動することを確認した [Okumura et al. 2016 PEPS]。この同位体システムチクスの大変動は、同じ微生物株を異なる生育条件で培養した場合であっても認められたため、微生物による二酸化炭素を基質にメタンを生成する一連の代謝経路を単純な単一メカニズムとして捉えては説明が困難であることに直面した。むしろ、生育条件によってブラックボックスの中に存在する代謝経路が劇的に変化した帰結として、同位体システムチクスの大変動が引き起こされているのではないかと考えるに至った。

このブラックボックスの中身を明らかにできる手法として、近年技術発達が目覚ましい技術が、トランスクリプトーム解析である。ある微生物が保有する全 DNA 情報であるゲノムが「個体内に潜在する代謝系」を示すのに対し、mRNA 群であるトランスクリプトームは「実際に駆動している代謝系」を示す。たとえば同じ代謝素反応を触媒しうる異なる酵素群を「アイソザイム」と呼ぶ。ゲノム情報はアイソザイムの「存在」を示す一方、トランスクリプトーム情報は実際に代謝系で駆動しているアイソザイムの「発現」を示す。

メタン生成代謝系は 7 段階の素反応で構成されるが、いくつかの素反応についてはアイソザイムが存在し、いずれのアイソザイムが発現するかは水素ガス分圧や増殖段階、必須微量元素濃度によって変わることが知られている [Reeve et al. 1997 J Bac; Morgan et al. 1997 J Bac]。反応触媒である酵素が異なれば反応速度や可逆性が変化することは自明であり、同一反応であってもアイソザイムの違い (=代謝経路の違い) によって同位体効果が変化すると推測されている [Valentine et al. 2004 Geochim Cosmochim Acta]。しかしアイソザイムの発現と代謝に伴う同位体システムチクスの相互関係についての実証研究はいまだ行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では『生育条件によって同位体システムチクスが異なる要因はアイソザイム発現様式の変化にある』という作業仮説の下、下記 3 項目を実施する。

- (1) メタン菌分離株のうち、ゲノム情報からメタン生成代謝においてアイソザイムを保有することが判明している 3 種について培養する。アイソザイムの発現支配要因とされる H<sub>2</sub> 分圧・増殖速度・必須微量元素濃度といった生育条件を変数とした培養を実施する。
- (2) 培養条件に対応して発現している酵素遺伝子を把握するべく、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施する。
- (3) メタン代謝に関わる基質・生成物 (CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O) の炭素・水素安定同位体組成を CF-IRMS 等で分析し、生育条件毎に同位体システムチクスを定量する。

本研究では研究期間を考慮し、対象をメタン菌のみに限定しているが、同様のアプローチはあらゆる微生物種・代謝系・安定同位体種に対して適応可能である。本研究の目的は、分離株培養・トランスクリプトーム解析・同位体分析の三位一体アプローチによって微生物代謝に伴う安定同位体効果と細胞内現象の相互関係を解明するという新たな研究方法の確立にある。研究方法の確立過程を通じて『メタン生成代謝に関連して駆動する代謝経路と炭素・水素同位体システムチクスの相互関係』が明らかになる。

本研究で実施する「培養に基づく同位体効果の調査」は、環境学/地球化学分野においてすで

に確立した手法であるが、本研究はこれに分子生物学/微生物生理学分野で培われた「培養に基づく遺伝子発現の調査」を融合する。トランスクリプトーム解析および CF-IRMS 分析という両分野の先端技術を導入することで、これまで知ることが困難であった細胞内現象と安定同位体組成環境動態の相互作用に迫る新たな試みである。

本研究の仮説が支持された場合、同位体システムチクスの主たる支配要因となる酵素が特定できる。これに基づき各酵素の構造決定を経ることで、代謝に伴う同位体効果について熱力学計算に基づいた推定が可能となる。熱力学計算に基づく同位体効果の推定は、これまでに利用されている指標を検証するのみに留まらず、多重置換同位体組成[たとえば Wang et al. 2015 Science]や分子内同位体組成[Toyoda & Yoshida 1999 Anal Chem]といった近年提案・利用されている新たな同位体指標についても、実証に先んじてその変動量を推定できる利点がある。また環境試料中の遺伝子発現を調べるメタトランスクリプトーム解析を実施することで、対象環境において発露している同位体システムチクスを推定することも可能となる。

作業仮説が棄却された場合、代謝に伴う同位体システムチクスを担う最大要因は、細胞内外での安定同位体組成の不一致に求められることになる。現在の同位体分析技術では、増殖中の細胞膜内から特定分子を取り出して安定同位体組成を定量することは試料採取技術・分析感度の両面から極めて困難である。この場合、「細胞内外の同位体不均一モデル」を新たな仮説として提案した上で、分析技術の発展を待つこととなる。

### 3. 研究の方法

本研究は、メタン菌を対象とした分離株培養・トランスクリプトーム解析・安定同位体分析からなる。ゲノム情報が明らかにされているメタン菌分離株を実験室で培養する。アイソザイム発現パターンを変化させることが知られている生育条件(水素ガス分圧・細胞増殖段階・必須微量元素濃度)を変数とした試料採取により、各試料で同位体システムチクスを調査する。同位体システムチクスを大きく変動させる主要因となる遺伝子発現を特定する。異なる 3 種のメタン菌を対象に同様の解析を実施することで、メタン菌(メタン生成代謝)における『生育条件～遺伝子発現～同位体システムチクス』の三者関係の普遍性あるいは種特異性を明らかにする。

メタン菌の分離株 *Methanothermobacter thermautotrophicus deltaH* を培養する。代表者自身が H<sub>2</sub> 分圧および増殖速度と同位体システムチクスの関連性を調べた実績があることから、計画の最初に取り組み対象として選定した。同種はゲノム情報が既に知られており、7 段階のメタン生成代謝のうち、たとえば第 4 素反応を触媒するアイソザイムが(H<sub>2</sub> 分圧あるいは増殖速度に依存して)補酵素 F420 に依存する methylene H4MPT dehydrogenase (Mtd) あるいは補酵素 F420 を必要としない methylene H4MPT dehydrogenase (Hmd) の間で切り替わることが知られている。前培養において自家発光の蛍光顕微鏡観察により細胞数を計数することで増殖速度を把握する。前培養での増殖速度を踏まえ、本培養では対数増殖初期・増殖終期・定常期の 3 期において培地試料を採取する。

それぞれの液体培地試料から菌体を集菌し、トータル RNA の抽出を行う。抽出したトータル RNA からイルミナ社の Ribo-Zero rRNA Removal kit を使用し、リボソーム RNA 除去後、シーケンスライブラリーを作製した上でイルミナ社 MiSeq にてシーケンスする。各試料あたり mRNA 由来の 100 万シーケンスリードの取得を目標とする。データ内にリボソーム RNA 由来のものが多く残される場合は、試供アーキアリボソーム RNA に特異的なプローブを作製し、除去効果を高める手法に変更する。作業仮説においてターゲットとしているアイソザイム群についての mRNA 発現量のみを調査対象とするのであれば、定量 RT-PCR で十分である。一方、メタン菌体内で起こる複雑な代謝系において、対象としているアイソザイム群はごく一部にすぎず、同位体システムチクス変動が対象アイソザイム群の発現パターンのみでは説明できないことも想定される。このため計画当初からトランスクリプトーム解析を用いることで、メタン生成代謝に直接関連する遺伝子群に加え、炭酸固定経路など細胞内での炭素・水素循環に関連する遺伝子群の発現までの網羅的把握を実施する。

採取した培地のヘッドスペースガスについて、CF-IRMS 法を用いて炭素(CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>)および水素(H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>)の安定同位体比を定量する。基質となる H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> は高濃度であるため、試料を純ヘリウムで満たしたバイアル瓶で適宜希釈した後に分析を実施する。H<sub>2</sub>O についてはキャピティリングダウン分光分析計により安定同位体比を定量する。本研究で利用する CF-IRMS 法については、平成 25-27 年度に実施した若手研究(A)によって、炭素同位体分析の一部自動化を実現している。

### 4. 研究成果

(1) *Methanothermobacter thermautotrophicus deltaH* の菌数増殖パターンと RNA 発現量の関係を調査できた。トータル RNA 回収率が想定より低いことが把握できた。回収率を向上させるには、嫌気条件下での菌体破碎等の作業が効果的である可能性が示唆された。

(2) 培地中の各種気体成分の水素炭素安定同位体システムチクスを分析できた。概して従来の研究で示されているのと同程度の速度論的同位体効果が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	酒井 早苗  (SAKAI Sanae)  (70512911)	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)・技術スタッフ    (82706)	
連携研究者	高木 善弘  (TAKAKI Yoshihiro)  (10399561)	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)・主任研究員    (82706)	