

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19234

研究課題名（和文）微生物機能覚醒による機能未知遺伝子の機能解明

研究課題名（英文）Elucidating gene function by awakening microbial activity

研究代表者

跡見 晴幸（Atomi, Haruyuki）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90243047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象に、実験室における培養環境と自然界における環境の違いに着目し、未だ認識されていない微生物機能の同定を目指した。本菌の培養法を、従来の酵母エキス・トリプトン等を含む培地から微生物の菌体を有機物源とした培地に変更した。本培養において *T. kodakarensis* の増殖が観察され、RNA seq解析の結果、多くの機能未知遺伝子・基質不明のトランスポーター遺伝子が劇的な転写産物量の上昇を示した。これらの結果から、従来の培養条件では利用されていない物質取り込み系等が、菌体を有機物源とした細胞で機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次構造からその機能が推定できない機能未知遺伝子はゲノム情報の半分以上を占め、それらの機能解明は生命科学における最重要研究課題の1つである。本研究ではアーキアを対象とし、従来の培養条件と大きく異なる条件で培養を行うことにより、従来培地で転写産物量の低い機能未知遺伝子の転写産物量を大きく上昇させることができ、それらの機能を解析するための手がかりをつかんだ。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the function of hypothetical proteins/genes on the genome of *Thermococcus kodakarensis*, we made dramatic changes to the growth medium. When we compared the individual RNA levels between cells grown with microbial cells or with the conventional medium containing yeast extract and tryptone, we found that the transcript levels of a large number of transporters with unknown function increased in the former medium. These transporters may not be necessary in conventional media, and may be involved in the transport of various organic compounds in the latter medium.

研究分野：応用生物化学

キーワード：微生物 アーキア ゲノム 機能未知遺伝子 培養条件 遺伝子の活性化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年は生物のゲノム解析が盛んに行われており、研究開始当初の時期までにゲノム解読がなされた生物は 60,000 種を越え、さらにメタゲノムの解析数も急速に増加し、11,000 種以上の配列がデータベースに収められていた。これらの大半は微生物のゲノムであり、微生物遺伝子の情報資源は莫大な量にまで蓄積していることは明白である。一般的に機能が明らかでないタンパク質と機能推定が可能な程度に相同性のあるタンパク質は微生物ゲノム上の約半数程度である(図1)。残り半数は全く機能推定できない一次構造を有するタンパク質(hypothetical protein)である。また解析されたゲノムの種類が増加するに伴い、annotation 可能な遺伝子は複数のゲノムに共通に存在することは多いが、同一の hypothetical

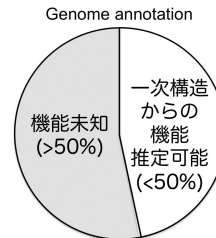


図1. 典型的な微生物ゲノムのアノテーション結果

protein は保存性が低く、ゲノム配列が決定される度に大幅に増加する。現在データベースに登録されている hypothetical protein の数は 169,919,247 (1.5 億個以上) である。この言わば配列過多の状況を解決するためにも、配列解析では同定できないタンパク質・遺伝子の機能を明らかにする手段の開発は重要であると言える。

申請者らはゲノム解析が普及し始めた当初から機能未知遺伝子の多さや割合の高さに着目し、それらの機能の解明に注力してきた。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を主な研究題材として、生化学的解析・比較ゲノム解析・転写産物量解析・遺伝学的解析等を実施し、機能未知遺伝子の機能解明に取り組んできた。これにより、代謝関連ではアーキア型 CoA 生合成経路の全容解明(1)、核酸の ribose 部位の代謝を担う pentose bisphosphate pathway の同定(2)などを達成してきた。これらの研究を通じて、機能未知遺伝子の機能同定はある程度進んだものの、依然としてあまりにも多くの遺伝子の機能が不明のままであった。そこで我々が未だ認識していない生命機能が数多く存在するのではないかと考えるに至った(図2)。またそれが我々の微生物を解析する手法に主な原因があるのではないかと考えた。そこで、実験室における培養環境と自然界における環境の違いに着目し、未だ認識されていない微生物機能の同定とメカニズム解明を目指すこととした。

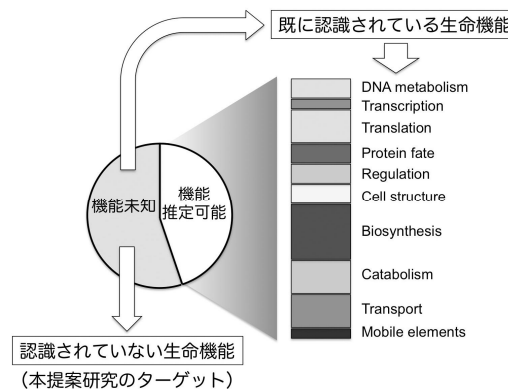


図2. 機能未知遺伝子の多さから示唆される未知生命機能の存在

### 2. 研究の目的

本研究では微生物ゲノム上に存在する大量の機能未知遺伝子に着目し、いままで“見落とされてきた”潜在的な微生物機能を“覚醒”させ、それらの機能の同定を目的とした。具体的な手段としては培養方法を変更し、その変更により機能未知遺伝子の転写が活性化されるような条件を探索する。

### 3. 研究の方法

微生物機能を見落としてしまう理由の1つに、研究対象となる微生物をまず“単離”することが最も一般的な研究戦略であることが挙げられる。多くの研究において、単一の微生物種を豊富な栄養源を含む培地で培養した上で対象となる生命機能の解析に取り組んできたのが現状である。しかし実際の生息環境ではこのような状況はほとんどなく、他の微生物との共存を含め、周辺環境は絶えず変化しているのが一般的である。実験室における培養条件では通常、生育に必要な栄養源を全て同時に与えているが、自然界では利用可能な栄養源の種類や濃度は絶えず変化している。このような自然環境中で微生物がいかに生命を維持しているのかに焦点を当てれば、新しい生命機能を見つける有力な手掛かりが得られると考えた。

ここでは従属栄養性の超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象とし、まずその培養法を従来の酵母エキス・トリプトン・アミノ酸などを含む培地(ASW-AA培地、ASW-YT培地)から変更して本菌の生育を検討することとした。増殖が観察された条件においては transcriptome 解析などを実施し、転写産物量が大きく増減する遺伝子の同定を目指した。これにより、機能未知遺伝子(hypothetical protein)の機能解明の手がかりをつかむことを期待した。

#### 4 . 研究成果

本研究より得られた結果は主に下記の通りである。

他の有機物を含まない条件下で *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株を種々の微生物の菌体ペレットとともに培養した。この培地では微生物菌体ペレットが *T. kodakarensis* の炭素源・窒素源となることを想定した。培養実験の結果、複数の微生物に対して、菌体を有機物源とした *T. kodakarensis* の増殖が示唆された。また、いくつかの菌体ペレットについてはペレットの形状が大きく変化したことも観察された。この形状変化は *T. kodakarensis* の細胞を添加しない場合は観察されず、また *T. kodakarensis* の前培養液から菌体を除いた場合においても観察されなかった。これらのことから微生物ペレットの形状変化は *T. kodakarensis* の何らかの作用により起こっていることが示唆された。*T. kodakarensis* を含む Thermococcales 目に属するアーキアは一般に元素硫黄存在下、有機物を酸化した際にはその電子を元素硫黄に渡して硫化水素を発生することが知られている。菌体ペレットを有機物源としたこれらの実験では、培養の経過にともないガスの発生が観察され、*T. kodakarensis* が増殖していることを支持した。

*T. kodakarensis* の増殖をさらに詳細に評価するため、培地中に含まれる *T. kodakarensis* の主要な酵素 glutamate dehydrogenase を定量した。抗 glutamate dehydrogenase 抗体を用いた Western blot 解析の結果、培養開始直後と比較すると培養開始から 4 h, 8 h, 12 h 後と時間の経過に伴って、glutamate dehydrogenase のシグナルが強くなっていることがわかった。この結果から、微生物菌体を栄養源として *T. kodakarensis* の細胞数が増加していることが強く示唆された。

*T. kodakarensis* を従来の ASW-YT 培地で培養し、transcriptome (RNA seq 解析) 解析を行い、どの程度の数の遺伝子が大きな転写産物量を示すのか、転写産物量と遺伝子機能の既知・未知との相関について検討した。その結果、あくまで相対値ではあるが 11 以上の RPKM 値を示すものは全遺伝子の 1/4 程度に過ぎないことがわかった。また全機能未知遺伝子の実に 87% は RPKM 値が 10 以下であり、機能既知あるいは推定可能な遺伝子と比較して機能未知遺伝子の転写産物量は低い傾向が見られた。

従来の ASW-YT 培地において生育した *T. kodakarensis* の transcriptome と微生物菌体を有機物源として生育したものの transcriptome を比較した。その結果、多くの遺伝子で数十倍以上という劇的な転写産物量変化が生じることが判明した。また、上位に上がってきている遺伝子は全く機能が推定できない hypothetical protein が大半を占め、転写産物量が顕著に増加した遺伝子の多くが機能未知遺伝子であることが明らかとなった。また興味深い結果として、基質不明の ABC トランスポーターと機能未知のメンブレンプロテインを含む遺伝子群が数多く転写産物量が増加していた。これらの結果から、ASW-YT 培地で培養した細胞では利用されていない物質取り込み系が、菌体を有機物源とした細胞で機能している可能性が示唆された。

(1) Shimosaka T, Makarova KS, Koonin EV, Atomi H. mBio. 10(4):e01146-19, 2019.

(2) Aono R, Sato T, Imanaka T, Atomi H. Nat Chem Biol. 11(5):355-360, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atomi H, Reeve J	4. 巻 165
2. 論文標題 Thermococcus kodakarensis: the model hyperthermophilic archaeon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1166-1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.000839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism in Archaea
3. 学会等名 International Congress on Metabolic Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 アーキア機能未知遺伝子の機能解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤永匠平、 跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアThermococcus kodakarensisの新たな有機物資化機構の探索
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism of Thermococcus and snapshots of early heterotrophy
3. 学会等名 6th ELSI Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>The Extremes of Life: Microbes and Their Diversity  <a href="https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity">https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity</a></p>
--

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