

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06080・19K21203

研究課題名(和文) 深海熱水噴出域細菌叢のメタエピゲノム解析から迫るDNAメチル化システムの進化史

研究課題名(英文) Evolutionary history of DNA methylation system of deep-sea hydrothermal field microbiota approached by metaepigenomic analysis

研究代表者

平岡 聡史 (HIRAOKA, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・特任研究員

研究者番号：70824423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、深海熱水噴出孔に生息する細菌叢を対象に、DNAメチル化修飾の多様性やそのシステムの進化解析を予定していた。ところが、おそらく夾叉物等の影響により、深海熱水噴出孔からのDNA抽出やシーケンスが困難であることが判明した。このため、研究対象を熱水細菌叢から海洋細菌叢に変更した。海洋微生物のDNAを十分量採取し、DNAの大量調製とPacBioシーケンサーを用いたショットガンシーケンシング、そしてパイオインフォマティクスによるデータ解析を行った結果、新規のものを含む複数の多様なメチル化モチーフを検出できた。本研究から、海洋環境における微生物エピゲノムに関する新規な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型のゲノム解析技術を用いることで、環境中の細菌叢(微生物集団)のエピゲノムを直接解明することを可能にする「メタエピゲノム解析」を、世界で初めて海洋水中の細菌叢に適用した。結果、既存の研究からは想像できないほど多様で普遍的なDNAメチル化モチーフを検出することに成功し、海洋環境中の細菌が持つエピゲノムの包括的な評価のための足がかりとすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I planned to investigate epigenomic landscape in deep-sea hydrothermal field microbiota using metaepigenomic approach to reveal the diversity and evolutionary history of prokaryotic DNA modification system. However, I found it would be difficult to extract DNA from hydrothermal sediment samples and genomic sequencing likely due to its background contaminants, and thus I changed the targeted environment from hydrothermal field to marine seawater.

I conducted seawater sampling, DNA extraction, and shotgun sequencing using PacBio sequencer. Several draft genomes were successfully reconstructed, and also a number of methylated motifs including novel ones were detected through bioinformatic analysis. The results of this study provide grate insight into prokaryotic epigenomics in the marine environment.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：メタエピゲノム解析 メタゲノム解析 海洋細菌 バイオインフォマティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム中の塩基のメチル基修飾 (DNA メチル化) に代表される、いわゆるエピジェネティクスが注目を集めている。エピジェネティクスはヒトを始めとする真核生物において、遺伝子の発現制御や獲得形質の遺伝などに深く関わっている (Heard & Martienssen. *Cell* 2015)。一方で原核生物においても、ファージ感染に対する防衛機構 (制限修飾系) や遺伝子転写制御、DNA 修復等の生理生態学的に重要な役割を担っており、近年の研究から 9 割以上の系統において DNA メチル化が普遍的に起きていると考えられている (Blow *et al.* *PLoS Biol.* 2016)。しかし、未培養系統群においては勿論、培養可能な系統群であっても単離培養されていない微生物に対しては、実験的な制約の為に DNA メチル化の観測が困難であり、自然環境中の細菌群集における DNA メチル化の普遍性や多様性は全く検証されて来なかった。

環境細菌叢の生理生態を解明する上で、ショットガンメタゲノム解析は非常に有効な手段である (Hiraoka *et al.* *Microbe. Environ.* 2016)。さらに近年、PacBio に代表される 1 分子シーケンシング技術の登場と発展により、DNA メチル化の検出が容易になりつつある。申請者は今までの研究で、淡水環境の細菌叢を対象に、PacBio を用いた系統網羅的な DNA メチル化の観測・解析手法 (メタエピゲノム解析) を確立し、僅か 2 試料の解析から、培養株ベースの既存研究からは想像もつかないほど多様な DNA メチル化モチーフや DNA メチル化酵素の存在を明らかにした (Hiraoka *et al.* *Nat. Commun.* 2019)。しかし、用いた試料中の微生物の系統的多様性は極定的であり、DNA メチル化というシステムの起源や、なぜほぼ全ての細菌・古細菌系統で保存されてきたのか、という進化学上の疑問の解明はその端緒についたばかりと言える。

2. 研究の目的

地球上における生命誕生の場と考えられる深海熱水噴出域では、還元的な高温熱水と酸化的な海水が混合することで、化学的・物理的に多様な環境が存在する。そして、そのような環境に適応的な、始原的系統群を含む極めて多様な系統群の細菌・古細菌が生息している (Martin *et al.* *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; Nakamura & Takai *PRPS.* 2014, Takai & Nakamura *Curr. Opin. Microbiol.* 2011)。このような深海熱水噴出域の細菌・古細菌を対象にメタエピゲノム解析を行うことで、DNA メチル化の始原的な形態を明らかにし、真核生物に至る進化の過程でどのようにこのシステムが獲得され大多数の系統で保持されてきたのか、という進化史上の未解明問題に一気に迫ることを目指す。なお上述の通り、メタエピゲノム解析は申請者独自の技術であり、現在までに深海熱水噴出域の微生物を対象とした DNA メチル化の研究は行われていない。

ショットガンシーケンスを行うにあたり、PacBio シーケンスリードは精度が低い (~86%)、これまでメタゲノム解析には利用されてこなかった。本研究では、通常 > 20kb のサイズで作成するライブラリをあえて短く設計し、環状化ライブラリを連続的に複数回読みエラー修正を行う、Circular Consensus Sequencing (CCS) 法を利用する。この手法は元来、完全長 cDNA (Iso-Seq) 用に利用される技術であるが、本研究では独自にメタゲノム解析に応用する。

3. 研究の方法

- (1) 深海熱水噴出域サンプルとして、熱水チムニー表面の堆積物を対象にメタエピゲノム解析を行う。サンプルはすでに申請者の所属研究機関 (海洋研究開発機構: JAMSTEC) で凍結保管されている試料を利用する。
- (2) PacBio Sequel を用いたショットガンシーケンスを行う。4~5kb サイズでライブラリを作成し、塩基配列決定精度 > 97% を達成する高精度の CCS リードを大量に取得する。
- (3) メタゲノム・メタエピゲノム解析を行い、DNA メチル化モチーフの検出を行う。具体的には、ゲノムアセンブリとピニングからドラフトゲノムを再構築し、遺伝子予測と機能アノテーションから遺伝子的特徴を明らかにする。また、各ドラフトゲノムにおけるメチル化塩基を検出し、DNA メチル化モチーフを推定する。
- (4) ドラフトゲノムから DNA メチル化酵素遺伝子と認識モチーフを予測し、その多様性を解析する。各アノテーションにはメチル化酵素配列データベースである REBASE を活用する。予測された新規の酵素・モチーフ対応関係は、大腸菌を用いて実験的に検証する。
- (5) メチル化酵素遺伝子配列の大規模な配列解析と系統解析から祖先配列再構成を行い、アミノ酸配列ベースの進化史を明らかにする。特にモチーフを認識する機能的部位に着目し、タンパク質の立体構造情報なども活用しながら、進化学的・生態学的な解釈を行う。

4. 研究成果

実際に熱水噴出孔周辺堆積物サンプルを用いた DNA 抽出とサンプル調製を行ったところ、当初の予想に反して、おそらくサンプル中に含まれる夾叉物等の影響により、ゲノムシーケンシングが正常に完了しないことが判明した。このため、研究対象を熱水細菌叢から海洋細菌層に変更し、研究の方向性を大きく修正する必要に迫られた。

新たなサンプルとして海洋微生物の DNA を十分量採取するために、太平洋沖合にて外洋表層海洋水の大量採水を行い、フィルター濾過を実施した。得られた細菌叢試料の一部を用いて DNA 抽出の実験検討を行い、ゲノムシーケンシングに十分な量を取得できる実験プロトコルを構築した。このプロトコルを用いて DNA の大量調製とショットガンシーケンシングを行い、配列データを得ることができた。バイオインフォマティクスによるデータ解析の結果、新規のものを含む

複数の多様なメチル化モチーフを検出できた。そして、これらのモチーフを認識すると推定されたメチル化酵素遺伝子を見出すことができた。現在、モチーフと酵素の対応関係を実験的に検証するために、大腸菌を用いた遺伝子組み換え実験を進めているところである。また、メチル化酵素遺伝子やそれらを持つ微生物系統の進化系統解析を行い、その進化史を議論していく予定である。

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 1件）

1. 著者名 Hiraoka Satoshi, Hirai Miho, Matsui Yohei, Makabe Akiko, Minegishi Hiroaki, Tsuda Miwako, Juliarni, Rastelli Eugenio, Danovaro Roberto, Corinaldesi Cinzia, Kitahashi Tomo, Tasumi Eiji, Nishizawa Manabu, Takai Ken, Nomaki Hidetaka, Nunoura Takuro	4. 巻 14
2. 論文標題 Microbial community and geochemical analyses of trans-trench sediments for understanding the roles of hadal environments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 740 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-019-0564-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平岡聡史
2. 発表標題 バイオフィォマティクスによる環境微生物生態へのアプローチ
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡聡史
2. 発表標題 環境微生物を対象としたゲノム情報解析の拡張
3. 学会等名 生命情報科学若手の会第11回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡聡史
2. 発表標題 環境細菌叢が持つゲノム修飾機構を明らかにする「メタエピゲノム」解析の提唱と実証
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Hiraoka
2. 発表標題 Metaepigenomic analysis reveals the unexplored diversity of DNA methylation in an environmental prokaryotic community.
3. 学会等名 11th Asian Symposium on Microbial Ecology (ASME) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡聡史 平井美穂、西澤学、松井洋平、高井研、野牧秀隆、布浦拓郎
2. 発表標題 北西太平洋海域から採取した深海・超深海堆積物の大規模菌叢構造解析
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡聡史
2. 発表標題 メタエピゲノム解析から明らかにする環境細菌叢のエピジェネティクスの多様性と新規DNAメチル化酵素
3. 学会等名 日本生物工学会バイオインフォマティクス相談部会第二回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平岡聡史、岡崎友輔、按田瑞恵、豊田敦、中野伸、岩崎渉
2. 発表標題 メタエピゲノム解析から迫る環境細菌・古細菌のエピジェネティクス
3. 学会等名 生命医薬情報学連合大会 2018大会 (IIBMP2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平岡聡史、岡崎友輔、按田瑞恵、中野伸、岩崎渉
2. 発表標題 メタエピゲノム解析が明らかにする環境細菌叢の DNA メチル化多様性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Hiraoka
2. 発表標題 Exploring microbial ecology using a metagenomics approach
3. 学会等名 Rinkai Hackathon 2018 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〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----