

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20710155

研究課題名(和文) 細胞内共生菌のシャペロニンのプロテオーム機能解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis of the chaperonin from intracellular bacterial symbiont

研究代表者

吉田 尊雄 (YOSHIDA TAKAO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号：60399566

研究成果の概要(和文)：

深海に生息する二枚貝のシロウリガイ類の細胞内共生菌は、宿主のエラの上皮細胞内に存在し、ゲノムを縮小するように進化している。共生菌のゲノムは、ゲノム縮小に伴い、遺伝子に変異が蓄積している可能性がある。本研究では、シマイシロウリガイの細胞内共生菌のシャペロニンを含む分子シャペロンの発現を調べ、ゲノム縮小進化に伴う遺伝子変異の緩衝剤として機能しているかどうかを検証する。

研究成果の概要(英文)：

Intracellular sulfur-oxidizing symbiotic bacteria in deep-sea *Calymene* clams are harbored within their gill epithelial cells, and its genomes have been reduced through intracellular association with the hosts. It is possible that the mutations accumulate in the genes. In this study, we examined the expression of molecular chaperone genes including the chaperonin in the symbiont of *C. okutanii*, and whether the chaperonin functions as buffer of mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：プロテオーム、ゲノム、進化、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

これまでに主に昆虫を中心に、動物と細菌の細胞内共生の研究から、細胞内共生菌では、タンパク質のフォールディングに関与する分子シャペロンの一種であるシャペロニンが常時、選択的かつ集中的に発現し、可溶タンパク質の約10%という大量に発現して

いることが明らかになっている (Insect Biochem. 12, 613-622, 1982; Symbiosis 8, 271-283, 1990; Current Microbiol. 32, 279-285, 1996)。シャペロニンは、一般的には熱ショックタンパク質なので普段の発現量は少なく、高温やストレス下において多量の合成が誘導される。何故、細胞内共生菌で

は、シャペロニンが常時選択的、かつ多量に合成されるのか問題となっている。

昆虫の細胞内共生菌のシャペロニンの大量発現については、近年では次のような仮説が有力である。昆虫の細胞内共生菌の全ゲノム情報などから、共生細菌は、卵を介して次世代に水平伝播する場合は、ゲノムサイズの縮小と遺伝子数が減少する進化をしている事がわかってきた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4454-4458, 2002; Current Biol. 17, R508-R510, 2007)。細胞内共生菌は、ボトルネック効果と遺伝的浮動により、世代が進んでゆくにつれて、遺伝子に軽度の有害変異が蓄積し、偽遺伝子化して最後にはゲノムから取り除かれるような進化をたどると考えられている (Curr. Opin. Microbiol. 5, 506-512, 2002)。細胞内共生菌では、遺伝子の軽度の有害変異が蓄積することにより、タンパク質のフォールディングができない遺伝子が生み出されている可能性がある。モデル生物を用いた実験で、遺伝子の変異に対して HSP90 やシャペロニンといった分子シャペロンは、変異の緩衝材として機能することが示されている (Nature 396, 336-342 1998; Nature 417, 618-624, 2002; Nature 417, 398, 2002)。よって、昆虫の細胞内共生菌は、シャペロニンを大量に発現させることで、弱有害変異が蓄積してフォールディングできないタンパク質を正常に働かせていると予想されている (Trends Genet. 20, 413-416, 2004)。

しかしながら、この現象は、昆虫の細胞内共生菌のみにおこる特別な現象ではなく、ゲノム縮小進化をたどるような細胞内共生菌に普遍的な現象であるかどうか？ わかっていない。また、実際に遺伝子に軽度の有害変異が入り、フォールディングできないタンパク質が存在し、それがどのような種類で、どのような変異が原因でフォールディングできなくなっているのか？ また、シャペロニン以外の分子シャペロンが、この現象に関与するか？ については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内共生菌のシャペロニンの大量発現が普遍的な現象であるかを調べ、その意味を探る。細胞内共生菌がゲノム縮小進化にともない、遺伝子に変異が実際に蓄積しているのか、その変異がタンパク質のフォールディングに影響しているのかを調べ、シャペロニンが変異の緩衝剤として機能しているのかの手がかりを得ることを目的とする。本研究では、昆虫以外では、唯一全ゲノム配列が決定しており、細胞内共生菌が卵を介して次世代に垂直伝播し、ゲノム縮小進化をしている、二枚貝のシロウリガイ共生菌 (サイズ 1.02Mbp、遺伝子数 937 個; Current Biol. 17, 881-886, 2007) を用いる。共生菌は、化

学合成細菌と呼ばれ、深海底下から供給される硫化水素などの無機物質を酸化することによりエネルギーを獲得して有機物を生産している独立栄養細菌である。宿主は、口や消化管が退化しており、自らの栄養を完全に細胞内共生菌に依存して生きている。本研究では、以下の点について、検討する。

- (1)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンを含む分子シャペロンの発現解析
- (2)シマイシロウリガイ共生菌の遺伝子変異解析
- (3)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンに結合しているタンパク質の解析

これらの解析から、細胞内共生菌のシャペロニン大量発現を明らかにできる。さらに、遺伝子に変異が入っているかどうか、また、フォールディングできない変異をしたタンパク質がどのような遺伝子で、その変異の実態がどのようなものであるかを推察でき、配列変異とタンパク質のフォールディングの関連を知ることができる。シロウリガイ共生菌は、宿主へのエネルギー供給源であることから、ミトコンドリアや葉緑体のような機能を果たしている。シロウリガイ共生菌のゲノム解析から、ゲノム縮小進化の途中段階で、これからも進行し、最終的にはオルガネラ化すると考えている。よって、本研究は、オルガネラの進化について言及できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、深海に生息するシマイシロウリガイを材料に用いた。深海調査用無人探査機を用いて相模湾初島沖の水深約 850m に生息するシマイシロウリガイを採取した。シマイシロウリガイは、採取直後の個体の他に、採取の際に生じる圧力や酸素濃度変化による影響を考慮して、採取直後に、加圧装置による生息していた圧力 (9MPa) に再加圧し 1 週間飼育した個体、大気圧下で 12 時間好気飼育した個体、大気圧下で生育環境に近づけるために泥に足部を差し込んで 1 週間飼育した個体をサンプルとして用いた。これらの個体は、採取直後、または飼育直後に素早く解剖し、細胞内に共生菌のいるエラ組織と共生細菌のいない組織とに分けて、RNA やタンパク質が分解しないように液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

また、採取直後の個体のエラ組織から共生菌の分離精製を行った。解剖したエラ組織をホモジェナイズにより細胞破碎を行い、未破碎細胞を遠心により取り除き、その後、 $41\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ のフィルター濾過を行い、その濾液を遠心して、精製共生菌とした。

(1)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンを含む分子シャペロニンの発現解析

分子シャペロニンの発現を RT-PCR で解析した。シマイシロウリガイの共生菌のゲノム解析の情報を元に、全遺伝子から分子シャペロンの中でも主要な働きをしている遺伝子（シャペロニン, DnaK, FtsH, SurA）とそれらの転写調節因子（RpoH）及び、同時にコントロール遺伝子（18SrDNA, 16SrDNA, チトクロムオキシダーゼ I, ルビスコ）を選び、それらの遺伝子上の数カ所で RT-PCR 用のプライマーを設計した。凍結保存したエラ組織からトータル RNA を精製し、DNase 処理を行い、DNA を含まない RNA を精製した。抽出した RNA 溶液中の残存 DNA の有無を調べるため、シマイシロウリガイ宿主 18SrDNA と共生菌 16SrDNA のプライマーを用いて PCR を行い、増幅しないことを確認した。精製した RNA から設計した特異的プライマーまたはランダムヘキサマーをプライマーとして cDNA を作成した。作成した cDNA をテンプレートとして、上記で設計したプライマーを使用して PCR 増幅を行なった。PCR 増幅産物をアガロース電気泳動により増幅を確認した。また、凍結エラ組織に PBS を加えホモジェナイズし、未破碎細胞を遠心により取り除き、その溶液のタンパク質濃度を測定し、タンパク質解析用のサンプルとした。また、精製した共生菌を PBS に懸濁し、超音波破碎後、タンパク質濃度を測定し、タンパク質解析用のサンプルとした。これらサンプルを SDS-PAGE サンプルバッファと混ぜ、5 μ g 分のタンパク質を 10%アクリルアミド SDS-PAGE により分離し、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜にトランスファーさせ、1 次抗体に、市販のウサギ抗シャペロニン抗体、2 次抗体にホースラディッシュペルオキシダーゼを付加した抗ウサギ IgG を用いてウエスタンブロッティングによる解析を行った。

(2)シマイシロウリガイ共生菌の遺伝子変異解析

シマイシロウリガイのエラ組織から共生菌を含む DNA を抽出し、次世代シーケンサー SOLiD により共生菌ゲノムのシーケンシングを行った。得られたリードは、マッピングソフト (SHRiMP) を用いて既にゲノム解析が完了しているシマイシロウリガイ共生菌ゲノム配列をリファレンスとして、マッピングし、ゲノム上における塩基のバリエーションを解析した。遺伝子上にどれだけの変異がみられるかを解析した。

(3)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンに結合しているタンパク質の解析
エラ組織ホモジェナイズにより調整したタ

ンパク質溶液、精製共生菌から超音波破碎により調整したタンパク質溶液に抗シャペロニン抗体を添加して、プロテイン A ビーズを用いて免疫沈降した物と、エラ組織ホモジェナイズにより調整したタンパク質溶液、精製共生菌から超音波破碎により調整したタンパク質溶液を pH レンジ 3-11 の等電点電気泳動と 12.5%アクリルアミド SDS-PAGE による二次元電気泳動により分離し、得られたスポットの定量及びスポットをゲルから切り出し、トリプシンを用いて 37°C 1 2 時間処理して完全消化し、抽出後、LC-MS/MS を用いたタンパク質同定解析を行った。スポットをトリプシン処理により分解したペプチドは、MagicC18 を用いた逆相カラムにより分離し、カラム 溶出後は nanospray ion source によりイオン化し、LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher) により質量分析した。MS の測定範囲は、450-2000 m/z のにて測定した。得られたデータは TurboSEQEST プログラムを用いて共生菌の遺伝子の配列データを元に、検索し、ペプチドの同定を行った。さらに発現している遺伝子について pET システムを用いた大腸菌による発現系を作成した。

4. 研究成果

(1)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンを含む分子シャペロニンの発現解析

シマイシロウリガイは、採取途中で、圧力変化に対応できないためか、死んでしまう個体が多く、採取直後の生きている個体を用いて解析したとしても、本来の状態を反映しているかどうか、判定が難しい。そこで、本研究では、採取直後の生きの良さそうな個体とともに、加圧装置を用いて飼育した個体、大気圧下のいくつかの条件で飼育した個体を用いて比較した。

まず、RT-PCR による解析では、エラ組織からの RNA 精製の段階で多量の DNA が含まれてしまうというトラブルが起こった。シマイシロウリガイのエラ組織は粘膜に包まれており粘性が高いため、RNA 精製キットの DNase 処理では DNA が完全に除去しきれないと考えられた。このことから精製 RNA 中に含まれる残存 DNA を除去するため、DNase 処理を繰り返し行うことで精製 RNA 中の残存 DNA を完全に取り除くことができた。用いたどの条件の個体においても、ランダムプライマー、特異的プライマーで cDNA 化したどちらの場合においてもコントロール遺伝子である 18SrDNA、チトクロムオキシダーゼ I、16SrDNA、ルビスコの増幅バンドが確認できた。これらのコントロール遺伝子は宿主、共生菌において細胞機能を維持する上で必要な遺伝子であるため、この結果は用いたエラ組織に異常がないことを示し

ている。同様に、シャペロニンの発現に関与する転写因子である RpoH もバンドが確認できた。このことから、解析に用いた採取直後の個体を含む飼育個体では、みな同じ発現をしていると考えられた。

シマイシロウリガイ共生菌の分子シャペロン関連遺伝子は、プライマー位置に関係なく各遺伝子ともほぼ同じ強度でバンドが確認できた。よって mRNA の量に応じて発現していると考えられた。転写因子である RpoH が認識する $\sigma 32$ 認識配列を持つ遺伝子と持たない遺伝子と比較すると、明確な $\sigma 32$ 認識配列を持つことがわかっているシャペロニン、DnaK、FtsH は、明確な $\sigma 32$ 認識配列を持たない SurA よりもバンドが濃いことがわかった。このことから分子シャペロニンの発現には $\sigma 32$ 認識配列が関係していることが確認できた。バンドの濃さは、シャペロニン=DnaK>FtsH>RpoH>SurA の順番となった。さらに、細胞質で働くシャペロニン、DnaK のバンドに対して、内膜やペリプラズムで働く FtsH、SurA のバンドの方が薄かったため、分子シャペロニンの局在位置も発現量を左右する要因ではないかと考えられる。シマイシロウリガイ共生菌のゲノム配列上には膜タンパク質が少ないことから、これも原因の一つと考えられる。解析に用いた採取直後の個体を含むすべての飼育個体では、発現に差がなかった。ウエスタンブロッティングの結果から、シャペロニンは、総蛋白量の約 5-10% 程度発現していると考えられ、比較的大量に発現していることがわかった。

(2)シマイシロウリガイ共生菌の遺伝子変異解析

細胞内共生菌がゲノム縮小進化にともない、遺伝子に変異が蓄積しているのか、検証するために、次世代シーケンサー SOLiD による解析を行った。次世代シーケンサーにより出力される大量の配列データをリファレンスとなる共生菌のゲノム上にマッピングし、リファレンスとの比較を行った。得られたデータ量は、共生菌の全ゲノム領域をくまなくカバーする配列が得られ、1塩基あたりの重複度は 200 倍程度であった。得られた配列を精査し、SNP を検出し、塩基のバリエーションを解析した。その結果、シロウリガイ個体内での共生細菌群集のゲノム配列には予想に反して顕著な塩基多様性が見られ、その変異率は $1.5\text{-}3.8 \times 10^{-4}$ と高い値を示した。変異により、アミノ酸置換が起こる部位を検索したところ、翻訳因子や特定の機能遺伝子に有意に偏っていることがわかった。

(3)シマイシロウリガイ共生菌のシャペロニンに結合しているタンパク質の解析 抗シャペロニン抗体を用いて、シャペロニン

を免疫沈降させ、シャペロニンに結合しているタンパク質の検出を試みた。しかし、結合量がすくないためか、うまく検出することができなかった。そこで、共生菌の発現しているタンパク質を 2 次元電気泳動で分離し、LC-MS/MS による同定を行った。その結果、二酸化炭素を固定するルビスコや硫黄代謝経路のタンパク質が多く発現していた。これらタンパク質の中で、等電点が異なるが分子量が一致する 2 つのスポットが同一タンパク質として同定できた。それらのタンパク質の多くが (2) の解析で遺伝子上に等電点が異なるバリエーションが存在することがわかった。これらのアミノ酸変異のタンパク質のフォールディングにおける影響を調べるために、二酸化炭素を固定する機能を持ち、シャペロニンの基質タンパク質としても同定されているルビスコについてワイルドタイプと変異体の大腸菌による組み換え体を作成し、現在、フォールディングの解析を行っている。また、スポットが、ゲノム縮小によってアミノ酸置換されたものであるか、検討している。

以上の結果から、シマイシロウリガイの細胞内共生菌は、シャペロニンを含む分子シャペロニンを多く発現しており、特にシャペロニンは、比較的大量に発現していることが明らかとなった。昆虫の細胞内共生菌と同様な結果と考えられ、シャペロニンが多く発現することは、垂直伝播される細胞内共生菌に普遍的に見られる現象であることが示唆された。今回は、シャペロニンの基質となるタンパク質の同定までには至らなかったが、次世代シーケンサーを用いた解析からシロウリガイ共生菌の遺伝子には塩基のバリエーションが存在し、これらは、タンパク質として存在している可能性が示唆された。アミノ酸置換の変異によりフォールディングに影響しているかどうか、シャペロニンによる関与を今後調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 吉田尊雄: “シマイシロウリガイ細胞内共生菌の分子シャペロン遺伝子群の発現解析” 第 11 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2008 年 5 月 24 日、京都、京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 尊雄 (YOSHIDA TAKAO)
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極
限環境生物圏領域・チームリーダー
研究者番号：60399566